
ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

**Propriétés bactériolytiques et anticytasiques
du venin de cobra.**

PAR LE Dr F. NOC

Travail du laboratoire de M. Calmette. (Institut Pasteur de Lille.)

L'étude comparée des venins de serpents et des toxines microbiennes a déjà permis de découvrir d'étroites analogies entre ces deux ordres de sécrétions. C'est ainsi qu'on peut les rapprocher, au point de vue physiologique, par la présence dans les venins, comme dans certaines cultures microbiennes, de neurotoxines ou d'hémolysines plus ou moins actives, et de substances capables de favoriser ou d'empêcher la coagulation du sang.

On a pu, d'autre part, constater dans les sérums des animaux la présence de diastases analogues à celles des venins, de sorte qu'à l'heure actuelle la sécrétion venimeuse constitue un intéressant sujet d'étude intermédiaire entre les sérums et les toxines microbiennes.

La liste n'est pas close de ces propriétés qui permettent d'étudier la biologie comparée des sécrétions cellulaires. S. Flexner et H. Noguchi ont déjà observé que les venins du cobra, du mocassin, du serpent à sonnettes, du daboia, du trimeresurus du Japon, renferment des cytolysines pour un grand nombre de cellules des animaux à sang chaud et à sang froid, et que ces cytolysines montrent une grande résistance aux températures élevées. Ces auteurs ont vu également que si l'on ajoute de petites quantités de venin à de la gélose nutritive, la bactériodie charbonneuse, le *B. coli*, le *B. typhique*, ensemencés sur ce milieu, se cultivent en donnant des formes d'involu-

tion. Les venins de serpents semblent donc posséder, à côté de l'action cytolytique sur les cellules animales, un pouvoir bactériolytique.

En poursuivant l'étude de ces phénomènes de bactériolyse par les venins, j'ai cherché à en saisir le mécanisme et à le comparer avec les phénomènes analogues provoqués par les sérums bactéricides et cytotoxiques.

I. — *Action bactériolytique du venin.*

Si l'on met au contact d'une solution de venin de cobra, aseptisée par la filtration sur porcelaine (solution à 1 0/0 dans l'eau salée à 9 0/00), des microbes sensibles, tels que le vibron cholérique, la bactérie charbonneuse en culture très jeune non sporulée, ou sa variété asporogène, on constate que ces microbes sont dissous en un temps variable par la solution de venin dans l'eau physiologique.

A l'examen microscopique direct on voit les vibrions de Koch s'immobiliser, puis se résoudre en granulations et disparaître dans le liquide. Le phénomène est lent à se produire, ses limites sont plus étroites que celles de l'action des sérums bactéricides, mais il faut tenir compte ici de la dilution inévitable des substances actives et de l'appauvrissement en venin que provoque la filtration. La bactériolyse est encore plus nette avec la bactérie : la membrane d'enveloppe semble se dissoudre, le microbe apparaît comme formé par une série de granulations mises bout à bout, qui finissent par se disperser et se dissoudre dans le milieu environnant. L'agglutination n'intervient pas, du moins avec le venin de cobra qui n'agglutine d'ailleurs ni les globules rouges ni les autres cellules animales.

On pourrait supposer tout d'abord qu'il s'agit là d'un phénomène propre à certaines espèces microbiennes très sensibles aux changements de milieu ; en réalité, l'action du venin se retrouve avec un grand nombre de bactéries, plus ou moins intense suivant les espèces. J'ai étudié ce pouvoir bactériolytique sur les microbes suivants, que je range, d'après l'intensité d'action du venin vis-à-vis de chacun d'eux, dans les groupes ci-après :

- I. — Bactéridie charbonneuse, var. asporogène,
Vibron cholérique, var. Massaouah.
- II. — Staphylocoque doré.
B. de la diphtérie.
B. subtilis (culture jeune).
- III. — B. de la peste,
B. de la diarrhée verte.
B. coli communis.
B. typhique,
B. de Friedlander.
- IV. — B. de la psittacose.
B. pyocyannique.
B. prodigiosus.

On pourrait comprendre dans un cinquième groupe le bacille de la tuberculose bovine, sur lequel le venin a paru inactif après contact prolongé de hautes doses, de même d'ailleurs que sur les microbes sporulés et les moisissures¹.

Je résume dans le tableau suivant les résultats de mes expériences avec les microbes des groupes I, II, III et IV. Les émulsions microbiennes dans l'eau salée à 9 0/00 provenaient de cultures de 24 heures sur gélose; après des temps de contact variables, à la température du laboratoire, les mélanges étaientensemencés dans des tubes de gélatine de 9 c. c. que l'on coulait en boîtes de Pétri. Pour le bacille diphtérique seul, j'ai employé la gélose en plaques, humectée de sérum de cheval chauffé. Les colonies étaient comptées après 24, 36 ou 48 heures d'incubation, suivant les microbes utilisés. Le signe ∞ indique plus de 3,000 colonies, trop denses pour être comptées exactement.

Série A. — *Temps de contact, 2 à 3 minutes; 1 mgr. de venin.*

	V. Koch.	Charbon asporogène.	Staphylocoque doré.	Diphtérie.	B. subtilis.	B. pestueux.	B. diarrhée verte.
H ² O.	739	468	∞	∞	∞	95	∞
V.C.	0	0	∞	532	51	101	∞
	B. coli.	B. typhique.	Psittacose.	B. de Friedlander.	Prodigiosus.	Pyocyannique.	
H ² O.	3060	1035	2000	∞	∞	∞	
V.C.	2039	1121	1928	∞	∞	∞	

1. Une expérience, faite sur *Trypanosoma Lewisi*, a montré chez cet hématozoaire une résistance relativement grande par rapport à celle des globules rouges du rat, dissous immédiatement par le venin de cobra à 1 0/0 : les trypanosomes ne se dissolvent qu'au bout de 20 à 30 minutes de contact.

Série B. — Temps de contact, 4 heures; 1 mgr. et 10 mgr. de venin.

	V. Koch. 1 mgr. 10 mgr.	Staphylocoque doré.		Diphthérie.	B. subtilis.	B. pestueux.	B. diarrhée verte.
H ² O.	920	» 439 3000		∞ »	∞ »	269 ∞	∞ ∞
V. C.	0	» 0 0		174 »	7 »	34 0	∞ ∞

	B. coli.	B. typhique.	Psittacose.	Friedlander.	Prodigiosus.	Pyocyanique.
H ² O.	∞ ∞	∞ ∞	∞ ∞	∞ ∞	∞ ∞	∞ 2736
V. C.	∞ 1151	∞ 0	∞ ∞	∞ ∞	∞ ∞	∞ 0

Série C. — Temps de contact, 20 heures; 1 mgr. et 10 mgr. de venin.

	V. Koch. 1 mgr. 10 mgr.	Charbon asporogène.		Diphthérie.	B. subtilis.	B. pestueux.	B. diarrhée verte.
H ² O.	1578	» 435 »		∞ 2153	∞ ∞	189 ∞	2090 3000
V. C.	103	» 0 »		0 0	1 0	58 0	424 10

	B. coli.	B. typhique.	Psittacose.	Friedlander.	Prodigiosus.	Pyocyanique.
H ² O.	∞ ∞	∞ ∞	∞ ∞	∞ ∞	∞ ∞	∞ ∞
V. C.	∞ 1321	202 0	∞ ∞	∞ 0	∞ 2902	∞ ∞

L'examen de ce tableau montre que les microbes résistant au venin, tels que le colibacille, le *B. prodigiosus*, le pyocyanique, etc., se multiplient malgré l'emploi de doses très élevées de venin; les doses faibles exercent sur eux une action favorisante, de sorte qu'après contact avec 1 milligramme de venin, le nombre des microbes est quelquefois plus élevé que dans l'émulsion d'eau salée physiologique.

Comment agit le venin sur les microbes? Auquel de ses composants doit-on attribuer l'action bactériolytique?

1° Il ne s'agit pas d'un phénomène de protéolyse, comme pourrait le faire supposer la présence dans les venins de diastases protéolytiques capables de dissoudre la fibrine, la gélatine, etc. J'ai constaté en effet que le pouvoir bactériolytique du venin dans sa solution *filtrée* à 1 0/0 ne disparaît qu'à la température de 85° maintenue une demi-heure. Or, la diastase protéolytique du venin en solution *non filtrée* à 1 0/0 est détruite par le chauffage à 80°. On sait de plus que le venin de cobra est très pauvre en ferment protéolytique; or, il est très actif vis-à-vis des microbes sensibles que ne dissout pas le venin de *Lachesis lanceolatus* (Vipéridés), éminemment protéolytique. Enfin, les microbes tués par le chauffage à 60°, pendant une heure, ne subissent que très faiblement l'action dissolvante qui s'exerce si nettement sur les bacilles vivants (bactéridie charbonneuse);

2° La substance bactériolytique du venin de cobra paraît également distincte de l'hémolysine. Celle-ci résiste à la chaleur bien au delà de 85°. De plus, le venin qui a dissous des microbes (charbon, vibron cholérique) à saturation, a conservé intégralement son pouvoir hémolytique sur les globules de cheval. On pourrait supposer toutefois que, le venin ayant dissous une grande quantité de corps microbiens, ce sont les produits de cette dissolution qui hémolysent les globules surajoutés : neutralisons alors le venin centrifugé et décanté par une dose suffisante de sérum antivenimeux : l'hémolyse n'apparaîtra plus, ce qui montre bien la non-intervention des produits bactériens dans cette réaction;

3° La bactériolyse n'est-elle pas sous la dépendance de la neurotoxine? Il est facile de voir que le venin ayant dissous les microbes à saturation est encore toxique au même degré que le venin neuf pour la souris et le cobaye. Si nous vérifions d'ailleurs la loi de l'accoutumance des êtres vivants aux poisons, antiseptiques ou toxines, nous constatons la complète indépendance de la bactériolysine et de la neurotoxine. On accoutume aisément, en effet, par des cultures successives, des microbes tels que le vibron cholérique, le bacille pesteux, à la substance bactériolytique du venin de cobra. Le vibron et le bacille de la peste finissent par pousser dans la solution limpide de venin : le vibron cholérique la trouble sans former de voile; il suffit d'ajouter à la solution quelques gouttes de bouillon pour que la culture acquière ses caractères habituels. Or, si l'on tue les microbes par le chauffage à 60° dans cette solution de venin-culture, on voit qu'elle est au même degré toxique qu'une solution neuve de venin;

4° Il ne s'agit pas, dans la destruction des bactéries par le venin, d'un simple phénomène de plasmolyse. Nous avons vu plus haut que le venin contient suffisamment de substances nutritives pour que de faibles doses de la solution, incapables de tuer tous les microbes d'une émulsion, en favorisent au contraire le développement. J'ai constaté d'ailleurs que le sérum antivenimeux chauffé renferme un anticorps pour la substance bactériolytique : une dose extrêmement faible de sérum antivenimeux chauffé suffit à annihiler la bactériolysine.

Le tableau suivant démontre nettement l'existence de cet

anticorps : l'expérience ici résumée a porté sur le vibron de Koch, les mélanges ont été ensemencés après 30 minutes de contact.

V. DE COBRA à 4 p. 100.	SÉRUM antivenimeux chauffé à + 56°.	SÉRUM normal de cheval chauffé à + 56°.	SOL. physiologique de NaCl	COLONIES sur gélatine.
0 c. c. 1	»	»	+ 0 c. c. 5	0
0 c. c. 1	+ 0 c. c. 01	»	+ 0 c. c. 4	853
0 c. c. 1	+ 0 c. c. 05	»	»	994
0 c. c. 1	+ 0 c. c. 1	»	+ 0 c. c. 4	1125
0 c. c. 1	+ 0 c. c. 3	»	+ 0 c. c. 2	944
0 c. c. 1	+ 0 c. c. 5	»	»	1075
0 c. c. 1	»	+ 0 c. c. 1	+ 0 c. c. 4	0
0 c. c. 1	»	+ 0 c. c. 5	»	0
»	0 c. c. 5	»	+ 0 c. c. 1	∞
»	»	0 c. c. 5	+ 0 c. c. 1	∞

Donc le sérum antivenimeux chauffé, à la dose de 0,01 c. c. ou de 0,05 c. c., neutralise l'action bactériolytique de 1 milligramme de venin de cobra, alors que le sérum normal chauffé, même à des doses plus élevées, est sans effet sur le venin. La lysine et le sérum antivenimeux paraissent d'ailleurs entrer en combinaison stable : par le chauffage à 80°, après dilution du mélange neutre de sérum antivenimeux et de venin, on ne restitue pas à ce dernier la propriété dissolvante ;

5° Le venin de cobra n'agit pas davantage sur les microbes, grâce à la présence d'une cytase (alexine). Les caractères bien connus des cytases ne se retrouvent pas ici (destruction à 55-56°, sensibilité à la lumière, altération rapide à la température ordinaire, etc.). On ne saurait non plus comparer l'action bactériolytique du venin à celle du sérum de rat, qui dissout la bactérie charbonneuse à l'aide d'une substance distincte de l'alexine vibrionicide, d'après les recherches de Malvoz et de Y. Pirenne. La lysine du sérum de rat paraît être une substance basique dont la neutralisation annihile l'activité. Or, le venin de cobra, en solution très active, est parfaitement neutre aux

papiers sensibles de tournesol, tandis qu'ils sont virés au bleu par le sérum de rat. De plus, le venin agit non seulement sur des microbes de même race, mais sur des espèces très différentes que respecte le sérum de rat, en particulier sur le bacille pesteux qui trouve au contraire dans ce sérum frais un milieu de culture favorable.

En résumé, le pouvoir bactériolytique du venin de cobra n'est dû ni à la présence d'une cytase, ni à celle d'une base ou d'un ferment protéolytique, ni à la plasmolyse, mais constitue une propriété spéciale du venin, émanant d'une cytolysine résistante à la chaleur, comparable à l'hémolysine et aux cytolysines récemment étudiées par S. Flexner et H. Noguchi.

Dans leur travail sur les cytolysines du venin, ces auteurs ont établi que les cellules animales, chauffées à 55° et inactivées, ne subissent pas la dissolution complète sous l'influence des venins qui détruisent les cellules fraîches. Ils concluent à l'existence de récepteurs cellulaires (endocompléments), qui fixent les ambocepteurs du venin. Dans le même ordre d'idées, j'ai observé que les bactéries tuées par le chauffage, pendant 1 heure à 60°, ne subissent pas la désintégration totale comme les bactéries vivantes. Mais tandis que Flexner et Noguchi concluent à la pluralité des cytolysines dans le venin pour différentes cellules animales, je n'ai pu établir pareil fait avec la bactériolysine : le venin saturé de vibrions cholériques, de telle sorte que la dissolution des vibrions ajoutés à plusieurs reprises ne se produise plus, est incapable de dissoudre une autre espèce microbienne très sensible, telle que la bactérie asporogène, et réciproquement. On comprendrait difficilement d'ailleurs l'existence, dans le venin, de cytolysines spécifiques pour une série d'espèces microbiennes.

Malgré l'ingénieuse hypothèse des endocompléments, nous ignorons quelle est la nature des cytolysines du venin. Je rappellerai seulement que certaines espèces microbiennes, telles que le bacille pyocyanique, lorsqu'elles ont subi l'autolyse dans les cultures, donnent naissance à une substance capable de détruire *in vitro* un grand nombre de microbes (pyocyanase). On peut supposer que la bactériolysine du cobra est un produit d'autolyse cellulaire analogue, mais d'origine plus complexe.

II. — *Fixation de l'alexine des sérums par le venin.*

Nous avons vu que le sérum de cheval chauffé n'empêche pas l'action vibrionicide du venin. Il n'en est pas de même du sérum frais. En utilisant les sérums frais de plusieurs espèces animales (cheval, rat, lapin, cobaye, poule, homme¹), j'ai constaté que les cytases de ces sérums ont la propriété de neutraliser la bactériolysine du venin de cobra. De plus, le venin empêche la cytase des sérums de détruire les microbes, de sorte que l'on observe ce double phénomène de la neutralisation d'une substance bactériolytique qui éloigne elle-même le complément des microbes sensibles.

S. Flexner et H. Noguchi ont déjà signalé le fait que les venins de cobra, de crotale, de copper-head suppriment le pouvoir bactéricide du sang de lapin et de chien. Ils ont conclu de leurs expériences que les venins n'agissent pas sur les corps intermédiaires du sérum (fixateurs, ambocepteurs), mais que le mécanisme de leur action consiste dans la fixation du complément.

Je résume dans le tableau suivant les faits que j'ai observés avec les sérums de lapin, de cheval, de cobaye et de rat, en présence soit du vibron cholérique, soit de la bactéridie charbonneuse asporogène.

Une expérience témoin permettait de s'assurer, dans tous les cas, que la dose de 5 milligrammes de venin de cobra provoquait la bactériolyse totale de l'émulsion mise en contact pendant 30 minutes pour chaque mélange. Tous les tubes étaient ramenés à 4 c. c. par addition de la solution de NaCl à 9 0/00, lesensemencements faits en gélatine, les colonies comptées en boîtes de Pétri.

1. Je dois à l'obligeance de M. Guérin, chef du laboratoire de sérothérapie à l'Institut Pasteur de Lille, et à celle du Dr M. Breton, de nombreux échantillons de sérum frais de cheval et de sérum humain. Je les en remercie vivement.

Sérum de lapin.	V. Koch.	Charbon asporogène.	Sérum de cheval.	V. Koch.	Charbon asporogène.
Sérum frais 0 ^{cc} .5	0	295	Sérum frais 0 ^{cc} .5	0	0
Sérum frais 0 ^{cc} .5 + V. cobra 5 mgr.	988	463	Sérum frais 0 ^{cc} .5 + V. cobra 5 mgr.	∞	∞
Sér. chauffé + 56° 0 ^{cc} .5.	2744	∞	Sérum chauffé 0 ^{cc} .5....	∞	∞
Sérum chauffé 0 ^{cc} .5 + V. cobra 5 mgr.	0	0	Sérum chauffé 0 ^{cc} .5 + V. cobra 5 mgr.	0	0
Solut. physiolog. 1 c. c.	972	903	Solut. physiolog. 1 c. c.	∞	966
Sérum de cobaye.	V. Koch.	Charbon asporogène.	Sérum de rat.	V. Koch.	Charbon asporogène.
Sérum frais 0 ^{cc} .5	2464	∞	Sérum frais 0 ^{cc} .5	0	0
Sérum frais 0 ^{cc} .5 + V. cobra 5 mgr.	∞	∞	Sérum frais 0 ^{cc} .5 + V. cobra 5 mgr.	2520	∞
Sérum chauffé 0 ^{cc} .5....	∞	∞	Sérum chauffé 0 ^{cc} .5....	1710	∞
Sérum chauffé 0 ^{cc} .5 + V. cobra 5 mgr.	0	0	Sérum chauffé 0 ^{cc} .5 + V. cobra 5 mgr.	0	0
Solut. physiolog. 1 c. c.	∞	∞	Solut. physiolog. 1 c. c.	4762	4800

On voit donc que les sérums frais sont susceptibles de neutraliser la substance bactériolytique du venin. Le chauffage préalable des mêmes sérums à 56° fait disparaître cette propriété. On voit en outre que l'action bactéricide des sérums alexiques de lapin, de cheval ou de rat est neutralisée par une dose convenable de venin de cobra.

En réalité, on obtient des résultats tout différents lorsque le temps de contact des mélanges est porté à 1 heure, 3 heures ou davantage au lieu de 30 minutes avant l'ensemencement sur gélatine. C'est que dans les sérums non bactéricides (cobaye, poule, homme), les microbes se multiplient très rapidement en présence des substances nutritives, et l'action bactériolytique du venin peut être masquée et devancée par cette multiplication excessive. Il est donc important, dans ces expériences délicates, d'établir d'abord les doses de venin et de sérum frais sûrement bactériolytiques en un temps très court, 20 à 30 minutes par exemple. On se rend compte de cette façon que c'est bien la cytase des sérums, qu'ils soient ou non bactéricides et agglutinants, qui neutralise la bactériolysine, puisque ces mêmes sérums chauffés à 56° sont inactifs vis-à-vis du venin.

J'ai dû constater toutefois une exception à cette règle, avec plusieurs échantillons de sérum humain qui, même chauffé à

56° et mis en contact un temps très court avec une dose sûrement bactériolytique de venin, paraît encore en neutraliser la substance active sur les microbes. Sans vouloir établir une relation quelconque entre les deux phénomènes, je rappellerai que la présence d'antifixeurs dans le sérum humain chauffé à 56° a été démontrée vis-à-vis des globules rouges de l'homme (Besredka), mais non pour d'autres globules. Camus et Pagniez ont observé d'autre part que le sérum humain chauffé est anti-cytasique vis-à-vis du sérum humain non chauffé. Enfin R. Pfeiffer et E. Friedberger ont affirmé, dans un travail récent, l'existence de substances antibactériolytiques, d'antiambocepteurs, dans les sérums normaux.

La fixation de l'alexine par le venin peut être démontrée non seulement vis-à-vis des microbes, mais encore vis-à-vis des globules rouges sensibles; en d'autres termes, le venin fixe l'alexine hémolytique, comme il fixe l'alexine bactériolytique. Il est facile de démontrer cette action antihémolytique, à la condition d'éliminer l'intervention de l'hémolysine propre au venin de cobra. J'ai employé dans ce but les globules de cheval, que dissout facilement le sérum frais de rat, et j'ai neutralisé l'hémolysine propre au venin par le sérum antivenimeux, qui est inactif sur les globules de cheval neuf et sur l'alexine du sérum du rat.

On prépare dans de petits tubes les mélanges suivants :

- 1) 0,5 c. c. de sérum frais de rat ;
- 2) 0,5 c. c. de sérum frais de rat, plus 0^{mgr},5 venin de cobra (0 c.c. 5 d'une solution à 1 0/00) ;
- 3) 0,5 c. c. de sérum frais de rat, plus 1 milligramme venin de cobra.

(Après 15 minutes de contact du venin avec l'alexine dans les tubes 2 et 3, on neutralise le venin par 1 c. c. de sérum antivenimeux pour le tube 2, 2 c. c. pour le tube 3) ;

- 4) 1 milligramme venin de cobra ;
- 5) 1 c.c. sérum antivenimeux ;
- 6) 0,5 c.c. sérum frais de rat, plus 1 c. c. sérum antivenimeux.

On ajoute à chaque tube 2 gouttes de sang défibriné de cheval; on place à l'étuve à 35°.

Dans les tubes 1 et 6 qui contiennent du sérum frais de rat

seul et du sérum frais additionné de sérum antivenimeux. L'hémolyse apparaît en quelques minutes. Dans le tube 4 qui a reçu le venin seul, l'hémolyse se produit aussi, en 1 heure. Elle ne se produit nullement dans les tubes 2 et 3 qui ont reçu le mélange neutre de sérum frais et de venin, ce qui montre bien la fixation de l'alexine hémolytique.

Dans ces tubes, le venin est intimement lié à l'alexine, puisque l'addition de sérum antivenimeux ne rend pas à celle-ci sa propriété dissolvante : d'autre part, le chauffage du mélange à 56° ne restitue pas au venin ses propriétés bactériolytiques : j'ai noté le fait avec les mélanges venin-cytase humaine, venin-cytase de lapin, venin-cytase de rat. Le venin joue donc ici le rôle d'un véritable fixateur ou ambocepteur.

Il se conduit, somme toute, à la façon des extraits d'organes. V. Dungern, P. Müller, Levaditi, E. Hoke ont déjà montré la fixation de l'alexine hémolytique par les extraits d'organes, les tissus, les cellules animales (foie, rate, spermatozoïdes, etc.). Le même fait s'observe d'ailleurs avec les solutions de peptone. La fixation de la cytase est donc une propriété générale de certaines molécules albuminoïdes.

Il était intéressant de chercher à reproduire, avec le venin de cobra, les expériences de Bordet sur les alexines et les antialexines. On pouvait espérer avoir dans cette substance un corps antialexique de conservation indéfinie, d'activité constante, qui permettrait de mesurer facilement la dose de cytase renfermée dans une petite quantité d'un sérum ou d'un autre liquide d'origine leucocytaire. L'expérience m'a montré que contrairement aux idées d'Ehrlich et de ses élèves et conformément aux résultats obtenus par Bordet avec les sérums et les toxines, la neutralisation du venin par la cytase et de la cytase par le venin se produit suivant des proportions variables : si une dose A de sérum frais est capable de neutraliser exactement 5 milligrammes de venin de cobra vis-à-vis d'un microbe sensible, en employant une dose 2 A, nous devons retrouver une dose 1 A bactéricide dans l'excès de sérum, suivant la théorie des proportions définies. Or cette action bactéricide ne se manifeste pas ; le sérum agit au contraire en sens inverse par ses substances nutritives, et dans le mélange 2 A + venin on obtient un plus grand nombre de colonies microbiennes que dans le mélange A + venin.

On voit donc que la propriété des cellules de fixer en excès la substance active des sérums, découverte par Bordet pour les hémolysines (phénomènes de teinture), se retrouve avec les extraits d'organes, du moins avec la substance bactériolytique du venin de cobra.

En résumé, il découle des faits qui précèdent que *le venin de cobra contient une cytolysine active sur les microbes et capable de fixer l'alexine des sérums normaux.*

L'application de ces données à l'animal vivant est évidemment remplie de difficultés, en raison de la complexité des substances qui entrent en jeu. Voyons cependant dans quelle mesure elles peuvent servir à expliquer les phénomènes qui se produisent à la suite de l'envenimation.

Kaufmann avait observé que les cadavres des animaux morts à la suite des morsures de serpents sont très rapidement envahis par les bactéries de la putréfaction. Welch et Ewing, rappelant ces phénomènes de putréfaction rapide dans la mort par le venin, l'expliquaient par la perte du pouvoir bactéricide du sérum. Aux pays chauds, même lorsque les morsures de serpents ne sont pas mortelles, elles se compliquent fréquemment de suppurations ou de gangrènes locales, provoquées par les microbes inoculés à l'occasion de la morsure.

L'analyse minutieuse des phénomènes d'envenimation montre, en réalité, que l'organisme subit des modifications différentes, suivant la quantité de venin injecté et suivant sa voie de pénétration. Lorsque la dose de venin est rapidement mortelle, soit qu'elle pénètre dans les veines, soit qu'elle diffuse sous la peau en quantité plus considérable, elle détermine une hypoleucocytose passagère, qui est d'ailleurs une réaction commune aux injections de venin, de propeptone, d'extraits d'organes, de toxines microbiennes (Delezenne, Nolf). Il s'ensuit que le sang recueilli peu de temps après l'injection peut être totalement privé de son pouvoir bactéricide, en raison de la disparition des leucocytes qui ont émigré dans les organes.

C'est ainsi que S. Flexner et H. Noguchi ont pu observer que le sérum d'un lapin, traité par dix milligrammes de venin de cobra, montrait cinquante-sept minutes après l'injection une grande perte des propriétés bactéricides. Mais il est impossible de conclure d'après la diminution du pouvoir bactéricide dans

cette expérience à la fixation de l'alexine par le venin. Comme la sécrétion de l'alexine est liée à la présence des leucocytes, l'hypo-leucocytose due au venin suffit à expliquer la perte du pouvoir bactéricide.

Toutefois, le venin ne borne pas son action à ces phénomènes d'ordre physiologique : en diffusant à travers l'organisme, il séjourne surtout dans les territoires où la circulation est ralentie, dans les capillaires des organes, où se trouvent déjà agglomérés et altérés les leucocytes qui ont disparu de la grande circulation. Là, les cytolytines du venin, poursuivant leurs effets, sont capables de neutraliser les alexines mises en liberté par la destruction des leucocytes, et c'est ainsi que s'explique facilement la pullulation rapide des bactéries de la putréfaction venues de l'intestin ou entraînées avec la morsure. On s'explique de même les suppurations qui compliquent les morsures non mortelles, malgré l'hyperleucocytose consécutive à la pénétration d'une faible dose de venin : il a suffi de la neutralisation immédiate de l'alexine mise en liberté au niveau de la plaie, pour permettre aux microbes de se multiplier.

On pourrait invoquer une action favorisante semblable dans l'inoculation des germes infectieux par les insectes piqueurs et suceurs. On sait que certains insectes (puces, punaises, moustiques, simules) inoculent une sécrétion de nature encore peu connue, mais qui détermine quelquefois une inflammation vive des tissus et contre laquelle les individus finissent par s'immuniser, caractères qui la rapprochent des sécrétions venimeuses. Il serait intéressant de rechercher si la pullulation locale des microbes pathogènes inoculés pendant la piqûre (peste, spirilles, etc.) est favorisée par la neutralisation de la cytase mise en liberté au niveau de la lésion tégumentaire.

Des considérations analogues s'appliquent naturellement à l'envahissement rapide du sang par les bactéries dans les infections graves. C'est ainsi que l'on a constaté dans les cas de mort par le charbon, la peste, la fièvre jaune, la pullulation rapide des microbes de la putréfaction et, même pendant la vie, l'envahissement du sang par le colibacille. On a noté également que, dans les cas graves de diphtérie ou de choléra, le sang et les organes se laissent envahir par les microbes spécifiques.

Tandis que les partisans du pouvoir bactéricide des humeurs ont vu là des faits en rapport avec la diminution du pouvoir bactéricide, M. Metchnikoff et ses élèves ont pu montrer que dans des cas semblables chez l'animal, il n'y avait jamais diminution, mais quelquefois au contraire une augmentation du pouvoir bactéricide du sérum, en rapport avec de l'hyperleucocytose. Cette divergence de vues s'explique bien si l'on n'oublie pas, en étudiant les rapports des microbes pathogènes avec l'organisme vivant, que certains phénomènes sont identiques à ceux que l'on constate *in vitro*, mais que d'autres bien observés *in vitro* sont très difficiles à vérifier chez l'animal infecté.

In vivo comme *in vitro*, les microbes mélangés au sérum sont capables de fixer l'alexine mise en liberté par suite de l'altération des leucocytes lésés par les sécrétions microbiennes. Mais la fixation de l'alexine ne suit jamais la loi des proportions définies, de sorte que le pouvoir bactéricide du sérum peut n'être pas modifié d'une façon évidente, et cependant la multiplication des bactéries a pu être momentanément favorisée. D'une part, en effet, les bactéries s'accoutument facilement à l'action des substances cytolytiques; d'autre part, la réponse des leucocytes à la pénétration des germes infectieux ne saurait se produire autrement que suivant la loi de Weber-Fechner, c'est-à-dire suivant le logarithme de l'excitation, de sorte qu'en présence d'une septicémie grave, on trouvera presque toujours hyperleucocytose et augmentation du pouvoir bactéricide. Il aura suffi néanmoins de la lésion de quelques leucocytes au niveau de la porte d'entrée pour que les microbes, mis à l'abri par leur propriété de fixer l'alexine nuisible, soit à l'extérieur, soit à l'intérieur des phagocytes, aient pu rapidement se multiplier grâce aux substances nutritives du plasma ou des cellules.

CONCLUSIONS

1° Le venin de cobra renferme, à côté de cytolyssines pour les cellules animales, une cytolyssine active sur plusieurs espèces microbiennes, mais à laquelle peuvent s'accoutumer les microbes les plus sensibles;

2° Cette cytolytine peut être neutralisée par le sérum anti-venimeux. Elle jouit, en outre, de la propriété de fixer, suivant la loi des proportions variables, l'alexine des sérums normaux ;

3° La fixation de l'alexine ou cytase par la cytolytine du venin permet d'expliquer la pullulation rapide des microbes de la putréfaction qui survient après la mort chez les animaux envenimés.

BIBLIOGRAPHIE

- S. FLEXNER and H. NOGUCHI. — Snake venom in relation to hæmolysis, bacteriolysis and toxicity. *Journ. of experim. medicine*, vol. VI, n° 3, mars 1902.
- S. FLEXNER and H. NOGUCHI. — On the plurality of cytolytins in snake venom. *Univ. of Pensylv. medical Bull.*, juillet-août 1903.
- MALVOZ. — Fixateurs du sérum normal du chien. *Ann. Inst. Pasteur*, août 1902, p. 625.
- YVO PIRENNE. — Recherches sur les alexines et les subst. microbicides du sérum normal. *Centralb. f. Bakter.*, I Abt. Orig., XXXVI Bd., 1904, nos 2 et 3, et *Centralb. f. Bakter.*, I Abt. Orig., XXXVI Bd., 1904, n° 5.
- BESREDKA. — Les antihémolysines naturelles. *Ann. Inst. Pasteur*, oct. 1901, XV, n° 10, p. 785.
- CAMUS et PAGNIEZ. — Existence d'une subst. antihémolysante dans le sérum humain. *Soc. biol.*, 6 juillet 1901, p. 730.
- R. PFEIFFER et E. FRIEDBERGER. — Ueber antibakteriolytische (antagonistische) Substanzen normaler Sera. *Deutsche medic. Woch.*, n° 1, 5 janv. 1905.
- V. DUNGERN. — *Münch. med. Woch.*, 1900, s. 677, 962.
- P. MULLER. — *Centralbl. f. Bakt.*, I Abt. 1901, Bd. XXIX, s. 860.
- WILDE. — *Ztsch. f. hyg.* 1901, Bd. XXXVII, s. 476.
- LEVADITI. — Sur les hémolysines cellulaires. *Ann. Inst. Pasteur*, mars 1903, n° 3, vol. XVII.
- E. HOKE. — Ueber Komplementbindung durch Organzellen. *Centralb. f. Bakter.*, I Orig., t. XXXIV, n° 7, 9 oct. 1903.
- J. BORDET. — Sur le mode d'action des antitoxines sur les toxines. *Ann. Inst. Pasteur*, mars 1903, n° 3.
- KAUFMANN. — *Rev. scientifique*, 1890, XLV, p. 180.
- WELCH and EWING. — *Lancet*, 1894, I, p. 1236.
- DELEZENNE. — Rôle du foie et des leucocytes dans le mode d'action des substances anticoagulantes. *Arch. de phys.* 1898, 5e série. X, p. 508; 568.
- P. NOLF. — De la nature de l'hypoleucocytose propeptonique. *Arch. internat. de physiol.*, Liège, Paris, vol. I, 1904, p. 242.
- E. METCHNIKOFF. — *L'immunité dans les maladies infectieuses*, Paris, 1901.
-

Sur un hématozoaire endoglobulaire nouveau

D'UN MAMMIFÈRE

PAR LE D^r J. J. VASSAL¹

Avec la planche X.

Au cours de recherches entreprises à Nha-Trang (Annam) sur les parasites du sang des Mammifères et des Oiseaux, j'ai pu étudier une Hémamibe nouvelle chez un Rongeur, *Sciurus griseimanus* (A. Milne-Edwards).

Cet Écureuil est appelé *con soc* par les Annamites. Il vit généralement dans les forêts, mais on le rencontre souvent près des habitations et des vergers. Il est friand de fruits et de bananes en particulier. Il n'est pas pourvu de membrane aliforme. Son pelage est gris cendré, sauf au ventre et à la partie interne des pattes où il revêt une belle couleur orange fauve. Sa taille est petite. Son poids ne dépasse guère 350 à 400 grammes. C'est un animal fort craintif et qu'il n'est pas aisé de prendre vivant. J'ai acheté celui-ci d'un enfant annamite qui l'avait capturé dans les environs du village de Culao, sur la rive droite de la rivière de Nha-Trang. Le piège avait dû être brutal, car notre petit rongeur était gravement blessé aux quatre membres.

Le 21 novembre 1904 il entra dans ma série d'animaux en expérience avec la dénomination « B. 175 *Sciurus* ♂ provenant de Culao ».

Je pratiquai le même jour l'examen du sang qui donna lieu aux constatations suivantes :

Le sang frais, étalé entre lame et lamelle, contient un grand nombre d'hématozoaires, qu'on peut distinguer tout de suite en schizontes et en gamètes.

Les schizontes sont à l'intérieur des globules rouges. Ils se présentent sous la forme de petits corps ovoïdes, transparents et réfringents. Ils mesurent généralement 4 μ . Ceux de 3 μ , 5 sont très rares. Quelques-uns atteignent 4 μ , 5. Il y en a 1 en moyenne par champ d'immersion, mais on peut en voir jusqu'à 6 dans un seul champ. La pigmentation dans ces formes jeunes

1. Note préliminaire in *C. R. Soc. Biologie*, 23 février 1905, p. 350.

n'existe pas. Les mouvements amiboïdes sont perceptibles, mais très lents.

Les formes sexuées sont pour la plupart des formes jeunes qui ne remplissent pas encore les hématies qu'elles renferment.

On peut apercevoir aussi des gamètes sphériques, arrivés à leur complet développement et qui sont extraglobulaires. Ils mesurent de $7\ \mu$ à $7\ \mu$. 5. C'est exceptionnellement que certains exemplaires atteignent $8\ \mu$.

La proportion des gamètes aux schizontes est de 1 à 20 environ.

Les gamètes renferment des grains de pigment très mobiles et très abondants.

Quelques instants après la sortie des vaisseaux, certains gamètes émettent des flagelles (microgamètes) qui s'agitent violemment et fouettent les globules voisins. Les flagelles ont une forme cylindrique très régulière ; leur extrémité libre est renflée et pigmentée. Ils ont 2 ou 3 fois la longueur du gamète. Des flagelles se meuvent, détachés et libres, dans le sang.

L'examen à l'état coloré permet de pousser plus loin la différenciation des divers éléments hémamibiens que nous venons de décrire.

La méthode de coloration de Laveran au bleu Borrel-éosine-tanin nous a fourni de belles préparations. Mais nous avons surtout employé la coloration de Romanowsky. On a ainsi les hématies colorées en bleu ardoisé transparent (bleu verdâtre sans surcoloration), les parasites en bleu, la chromatine en rouge rubis (voir fig. 1 à 15). En colorant par la nouvelle solution de Giemsa, les hématies se teignent en lilas, et les parasites montrent une coloration différentielle des plus nettes (voir fig. 16-27).

Les schizontes apparaissent formés d'un protoplasma mince, qui se teint en bleu sur les bords, et d'un noyau. Ils figurent de fins anneaux (fig. 1-3). Il est impossible de les différencier des formes jeunes de la fièvre tierce tropicale maligne (*Laverania malarix*).

Les globules rouges conservent leurs dimensions et leurs réactions chromatiques habituelles. Les points de Schüffner font défaut.

Les gamètes se colorent de deux manières bien tranchées,

ce qui permet de les distinguer en mâles et femelles. Leurs dimensions ne diffèrent pas notablement d'un sexe à l'autre. Ils sont uniformément sphériques (fig. 12-15).

Cependant, chez les individus jeunes, les dimensions sont de 6 à 7 μ et la forme est ovoïde; les restes de l'hématie sont visibles sur les bords (fig. 10, 11, 18).

Les *gamètes mâles* ont un noyau, le plus souvent central, souvent allongé, bien développé, renfermant, suivant son axe, un amas assez volumineux de chromatine rouge rubis. Le protoplasma se teint faiblement en bleu, les grains de pigment sont disséminés sur le fond clair (fig. 14, 15, 19).

Les *gamètes femelles* affectent une grande affinité pour le bleu. Ils apparaissent uniformément bleu sombre. Leur diagnostic est ainsi facile entre les formes mâles et les formes amiboïdes des schizontes. Le noyau est petit et souvent placé sur un des bords. Le pigment est plus sombre et forme des groupements autour du noyau (fig. 12, 13, 20, 21).

Disons tout de suite que notre Écureuil a seulement pu être examiné pendant 8 jours.

Le 22 novembre, les schizontes sont encore très nombreux. Il y en a 1 en moyenne par 2 à 3 champs du microscope. Dans un seul champ, il n'est pas rare d'en compter 4 et 5.

Les formes en anneaux sont les plus communes. Elles mesurent pour la plupart 4 μ . On remarque ensuite quelques formes amiboïdes de 6 à 7 μ au maximum, qui sont encore grêles et n'occupent que la moitié ou les deux tiers des hématies (fig. 4-7).

Pas de changements pour les gamètes. Moins de gamètes jeunes peut-être.

Le 23 et le 24, les schizontes et les gamètes sont dans des proportions égales.

Les anneaux ont augmenté de volume. Mais ce sont maintenant les formes de 6 à 7 μ qui dominent. Elles n'ont jamais de grandes dimensions et les globules rouges les contiennent aisément tout en restant normaux.

Ces schizontes sont pigmentés (fig. 8, 9). A noter encore des gamètes nettement intraglobulaires et n'ayant pas achevé leur évolution.

Le 25, les gamètes se rencontrent par 3 et 4 dans le même champ d'immersion. Les formes amiboïdes ont gagné en étendue

et leur pigmentation est plus accusée. Mais, à partir de cette date, les gamètes offrirent souvent l'aspect vacuolaire.

En dehors de la vésicule nucléaire, on observe une grande vacuole dont le contenu est incolable et qui donne nettement l'impression d'un espace vide (fig. 17, 22, 26).

Le 28, les formes sexuées sont plus nombreuses que jamais.

Il ne m'a pas été donné d'observer de figures en rosaces. Mais il n'est pas rare de trouver des formes qui renferment 2 grains de chromatine, plus ou moins éloignés l'un de l'autre, au lieu d'un seul (fig. 27). Il y a certainement là un début de division.

Le sang a toujours montré de l'hyperleucocytose, où les mononucléaires et les hémato blasts de Hayem tenaient le premier rang.

Notre Écureuil meurt le 19 novembre. Les plaies que le piège avait produites aux quatre membres s'étaient enflammées et avaient suppuré les 3 derniers jours.

Les températures ont été prises 2 fois par jour. D'abord la courbe est comprise pendant 48 heures entre 37°,6 et 37°,9. Elle accuse ensuite une ascension qui se maintient, du 24 au 28, entre 38°,2 et 39°,7. Sa chute est brusque avant la mort. La poussée thermique des derniers jours est évidemment en rapport avec la suppuration dont l'animal était atteint.

L'autopsie ne révèle aucune lésion macroscopique importante. La rate est normale. Les autres organes n'ont rien de particulier, sauf le foie qui est gros, très congestionné et d'une couleur noirâtre. Le cerveau et la moelle sont normaux. Il n'y a pas de parasites dans le liquide céphalo-rachidien.

Dans le sang du cœur, les hématozoaires sont très nombreux. Ce sont des gamètes, la plupart déformés et en dégénérescence vacuolaire.

Quelques exemplaires paraissent plus grands que ceux qui ont été observés pendant la vie. Ils mesurent entre 8 et 9 μ .

On n'arrive pas à déceler d'autres formes sexuées. Des croissants n'ont pas été vus dans le sang du cœur, pas plus que dans les autres organes. Dans la rate et les reins, les gamètes sont très nombreux et seuls. Les remarques précédentes leur sont applicables.

La parenté de l'hématozoaire de l'Écureuil me sembla assez

voisine de celle des hématozoaires pathogènes de l'homme pour m'engager à tenter l'inoculation à l'homme.

J'ai choisi la voie intraveineuse. Des expériences instituées d'abord par Gerhardt, puis répétées par de nombreux auteurs, prouvent que quelques gouttes de sang malarique inoculées à un homme sain reproduisent la fièvre du type inoculé. Celli prétend même « qu'il faut une dose minime, beaucoup moindre qu'une goutte. Il suffit, ajoute-t-il, de piquer avec la seringue de Pravaz simplement teinte de sang pour voir se reproduire non seulement la fièvre, mais encore le type fébrile et l'espèce d'hémospordie qui caractérisent l'infection inoculée ».

Je me suis donc placé dans des circonstances très favorables en adoptant la technique suivante. Une seringue de Pravaz stérilisée a été simplement lavée avec une solution d'oxalate de potasse à 5 0/00. Je m'en suis servi pour aspirer rapidement 4 à 5 gouttes de sang de la queue de l'Écureuil, qui ont été injectées aussitôt dans la veine médiane du bras droit de mon infirmier, l'Annamite Vo-Minh-Pho, qui s'offrit de lui-même pour cette expérience. L'opération fut pratiquée le 23 novembre.

Pho a 20 ans. Il est né à Long-dien, province de Baria (Cochinchine). Peu de sujets annamites auraient été d'un meilleur choix, car celui-ci n'a jamais eu la fièvre et, de plus, il est capable de s'observer avec intelligence. Sa rate est normale. A aucun moment il n'a présenté d'hématozoaires dans le sang. Du 23 novembre au 17 décembre, les températures axillaires ont été notées 2 fois par jour. Elles sont restées normales, entre 35° 7 et 36° 7. Peut-être ne mériteraient-elles pas d'être citées, si elles n'étaient intéressantes à un autre point de vue. J'ai parfois noté chez les Annamites une tendance à l'hypothermie. Celles-ci peuvent être prises comme exemple. Pho n'a jamais ressenti le moindre phénomène. Il sert chaque jour dans mon laboratoire et à l'ambulancesans que j'aie pu noter le plus petit changement dans son état de santé. S'il est permis de tirer une conclusion d'une expérience négative unique, je dirai que, jusqu'ici, le parasite du sang de l'Écureuil n'est pas inoculable à l'homme.

J'ai poursuivi des essais d'inoculation d'abord sur 2 singes, puis sur des lapins, des cobayes et des pigeons.

Deux *Macacus rhæsus*, femelles, depuis longtemps en captivité à Nha-Trang et dont la teneur hématologique m'était

bien connue, ont été injectés simultanément dans les veines et sous la peau, l'un le 22 novembre, l'autre le 26.

L'un des macaques mourut 7 jours après, des suites d'une phlébite peut-être causée par l'inoculation. L'autre vécut jusqu'au 5 janvier 1905, c'est-à-dire quarante-cinq jours après la piqure. L'examen du sang fut pratiqué chaque jour. A l'autopsie chacun des organes et les humeurs de l'organisme furent l'objet de recherches spéciales. Le résultat fut négatif.

Pour le premier, l'expérience est incomplète. Mais il n'en est pas de même pour le deuxième singe. Elle est assez démonstrative pour qu'on puisse en conclure que le singe macaque est réfractaire.

Les inoculations au lapin eurent lieu sous la peau pour l'un, dans la veine marginale de l'oreille et sous la peau pour l'autre. L'examen du sang a toujours été négatif. Un lapin est mort 26 jours après l'injection, l'autre est encore vivant le 12 janvier 1905.

Deux cobayes injectés largement avec le sang de notre Écureuil se sont montrés complètement réfractaires. L'examen quotidien du sang reste encore sans résultat 38 jours après l'épreuve.

J'ai enfin tenté de contaminer le pigeon. Deux sujets jeunes et n'accusant pas d'Haltéridiums dans leur sang ont reçu quelques gouttes de sang de l'Écureuil B. 175, l'un dans une veine de l'aile, l'autre sous la peau. Vingt-cinq jours après, ils ont montré tous les deux en même temps des Haltéridiums dans leur sang. L'un d'eux est mort avec des signes d'anémie très accusée et une pullulation considérable d'hématozoaires dans le sang, l'autre est encore vivant. Ces pigeons ne sont pas restés en contact avec d'autres pigeons au sang parasité, mais leur cage n'était pas protégée contre les moustiques et autres insectes piquants. Ils ont suivi la loi commune des pigeons de Nha-Trang qui veut que l'Haltéridium existe chez un très grand nombre d'individus.

Mes pigeons se sont montrés également réfractaires et n'ont pas reproduit dans leur sang le parasite de l'Écureuil.

Je ne parlerai pas de l'inoculation d'écureuil à écureuil. J'étais cependant arrivé à me procurer à grand-peine un sujet mâle semblable au premier. Je m'étais assuré que son sang ne

contenait pas d'hématozoaires et je venais de lui injecter quelques gouttes du sang de l'écureuil malade quand il succomba. L'autopsie m'a permis de constater que l'infection naturelle n'existait réellement pas. La capture avait dû être accidentée et notre écureuil avait alors subi un traumatisme dont il est mort.

En résumé, l'hématozoaire de *Sciurus griseimanus* ne s'est pas montré inoculable, dans mes expériences, à l'homme, au singe macaque, au lapin, au cobaye et au pigeon.

Quels sont les rapports à établir entre ce nouveau parasite du sang et ceux qui sont déjà connus? Quelle place lui assigner dans la classification des *Hæmocytozoa* par Laveran.¹?

Il répond parfaitement à la définition des *Hamamæba*: « hématozoaires endoglobulaires, en général pigmentés, présentant une forme de reproduction endogène et une forme de reproduction sexuée (exogène) avec des flagelles constituant les éléments mâles ». Il se rapproche beaucoup des Hémamibes de la malaria humaine. Il leur est plus apparenté qu'aux hémamibes des chauves-souris de Dionisi² ou des singes de Koch³ et Kossel⁴.

Cependant, comme chez ces derniers, les formes sexuées sont très nombreuses. Mais tandis que les hématozoaires des singes de l'Afrique revêtent rarement la forme endoglobulaire, ceux de l'écureuil d'Annam la présentent dans une proportion élevée.

Les points de comparaison avec les Hémamibes humains sont très importants. On a déjà pu s'en apercevoir au cours de cet exposé.

Il n'est pas possible tout d'abord de distinguer les schizontes jeunes de l'écureuil de ceux de la fièvre maligne tropicale (*Laverania malarie* Grassi et Feletti).

Les hématies ne sont pas déformées. Les formes adultes peuvent également se comparer étroitement à celles du même hématozoaire humain.

Les gamètes sont bien sphériques comme ceux des *Plasmo-*

1. *Cinquantenaire Soc. Biologie, Livre jubilaire*, Paris, 1899; *C. R. Soc. Biologie*, 1904.

2. DIONISI, *Atti. d. Soc. gli Studi d. malaria*, t. I, p. 433.

3. KOCH, *Reisberichte*, etc. Berlin, 1898.

4. KOSSEL, *Zeitsch. f. Hyg.*, t. XXXII, 1898.

dium (sensu stricto). Mais ils n'ont pas, comme ceux-ci, une endance à accroître leurs dimensions.

Signalons, comme différence importante avec l'hématozoaire du paludisme, l'existence de formes vacuolaires qu'on n'avait jamais signalées chez le parasite humain.

L'histoire de notre Hémamibe, à peine commencée, permettra peut-être de vérifier des hypothèses d'un grand intérêt. La première est relative à la faculté de certains Vertébrés, autres que l'homme, de servir d'hôtes au parasite de la malaria. Manson pense que l'homme n'est vraisemblablement pas le seul être où peut s'accomplir l'évolution schizogonique de l'*Hæmamaeba malaricæ*. Cette manière de voir est appuyée par les considérations suivantes :

Certaines régions de l'Inde et de l'Afrique, où la population est presque nulle, sont remarquables par la prédominance et la virulence de l'endémie palustre. Si l'homme est indispensable au cycle de développement complet de l'hématozoaire du paludisme, comment expliquer, dans ces circonstances, la généralisation d'un tel paludisme ? Quand des travaux de canalisation et de débroussaillage sont entrepris, dans des pays inhabités, pour la construction de routes et de voies ferrées, l'homme est très vite pris d'une infection malarique grave. Où se trouvaient contenus les germes primitifs ?

Ce n'est pas la première fois qu'on a émis l'hypothèse que quelque mammifère sauvage pouvait prendre la place de l'homme dans le cycle évolutif de l'hématozoaire de Laveran. Mais jusqu'ici aucun fait n'est venu étayer cette hypothèse. Nous espérons pouvoir aborder ce problème quand nous aurons à notre disposition d'autres Écureuils parasités.

Quoi qu'il en soit, cet hématozoaire nouveau semble devoir prendre place parmi les *Hæmamaeba* : et c'est probablement le plus voisin de celui de l'homme que l'on ait encore rencontré.

Explication de la planche.

Les figures 1-15 sont faites d'après des préparations colorées au Romanowsky (H, hématie normale), les figures 16-27 d'après les préparations traitées par la solution de Giemsa (H, hématie normale).

1-3. — Formes jeunes endoglobulaires.

4-7. — Schizontes non pigmentés.

8, 9. — Schizontes pigmentés.

10. — Jeune forme.

11. — Jeune forme.

12, 13. — Gamètes femelles, adultes, extraglobulaires

14, 15. — Gamètes mâles adultes, extraglobulaires.

16, 17, 22. — Jeunes gamètes femelles endoglobulaires; fig. 17 et 22 sont vacuolaires.

18. — Gamète femelle encore endoglobulaire, presque adulte.

19. — Gamète mâle adulte, extraglobulaire.

20, 21. — Gamètes femelles adultes, extraglobulaires.

23-25. — *Idem*, mais vacuolaires.

26. — Gamète mâle adulte, vacuaire.

27. — Forme avec 2 noyaux.

Sur la signification du "Bacillus coli"

dans les eaux potables.

PAR M. H. VINCENT

Médecin-major de 1^{re} classe, Professeur au Val-de-Grâce.

I

L'étude microbiologique des eaux de boisson a permis d'y faire, dans un nombre de cas qui devient de plus en plus grand, la constatation du *Bacillus coli communis*. La signification attribuée à ce microorganisme a subi des fortunes diverses. En raison de son existence normale dans le tube digestif de l'homme et des animaux, la présence du colibacille dans certaines eaux a, primitivement, acquis une valeur particulière : elle est devenue synonyme d'infection par les matières fécales et, pendant plusieurs années, cette proposition a régné comme une sorte de loi.

Il faut convenir que, si elle eût été démontrée, cette affirmation eût singulièrement simplifié l'appréciation de la qualité des eaux potables. Mais les recherches ultérieures n'ont pas tardé à établir l'extrême fréquence du colibacille dans un grand nombre d'eaux alimentaires. Miquel et Kruse, Duclaux, Lévy et Bruns, Weissenfeld, A. Moroni, etc., ont signalé avoir isolé ce microbe dans des eaux cependant à l'abri de tout soupçon. M. Chantemesse l'a rencontré dans toutes les eaux de Paris où il en a fait la recherche systématique¹. L. Grimbert l'a trouvé constamment dans les eaux de puits ou de rivière². D'après Miquel³, le *B. coli* a existé, en 1902, dans la Vanne, dans 91,6 0/0 des analyses; dans la Dhuys, dans 63,7 0/0; dans l'Avre, dans 55,7 0/0.

Il résulte de ces constatations qu'après avoir considéré le *B. coli* comme un témoin précieux et incontesté de la pollution

1. CHANTEMESSE, *Tr. de Pathol. gén.* publié par Bouchard, t. II, p. 400.

2. GRIMBERT, *Congrès intern. d'Hygiène*, Bruxelles, 1903.

3. MIQUEL, *Trav. de l'année 1902 sur les eaux d'alimentation de la ville de Paris*, publiés par la Préfecture de la Seine, Paris, 1903.

des eaux par les matières fécales ou les substances organiques en putréfaction, on a, par une réaction peut-être excessive, regardé ce microbe comme un saprophyte absolument banal et sans signification particulière.

La vérité me paraît être entre les deux affirmations extrêmes. C'est ce que je me propose d'essayer de démontrer dans le présent travail. Peut-être en résultera-t-il des conséquences pratiques relatives à l'analyse bactériologique des eaux de boisson.

II

1° *Le Bac. coli n'existe pas dans toutes les eaux.*

Il paraît superflu d'établir que toutes les eaux ne sont pas habitées par le bacille du côlon. Cependant certains bactériologues n'ont pas craint d'affirmer le contraire. A. Moroni, ayant analysé les eaux de puits de la ville de Parme et celles d'un grand nombre de sources des environs de la ville, constate ce microbe dans la plupart d'entre elles et va jusqu'à conclure que si sa technique eût été meilleure, il eût trouvé le bacille dans tous les échantillons.

Cependant, s'il est facile de comprendre la présence du *B. coli* dans les eaux de surface, il est un ensemble d'eaux dans lesquelles sa présence est plus exceptionnelle : ce sont les eaux de profondeur. Pour que le bacille d'Escherich existe dans une eau, il est nécessaire, en effet, que celle-ci se soit trouvée en contact soit avec des matières fécales ou des substances organiques qui en dérivent (fumier), soit avec les couches superficielles du sol. Lorsque les eaux profondes renferment ce microbe, c'est qu'elles ont été mal captées ou protégées insuffisamment contre la contamination extérieure, mais elles sont originellement pures, de même, du reste, que les assises géologiques à travers lesquelles elles circulent. J'ai analysé un certain nombre d'eaux artésiennes : toutes étaient exemptes de *B. coli*, sauf celle du puits artésien de Maisons-Laffite. Mais cette dernière reçoit des infiltrations de la Seine.

D'autre part, j'ai recherché en vain le même microbe dans beaucoup d'eaux de source. Malvoz, tout en admettant la fréquence du colibacille dans les eaux, a également mentionné son absence ordinaire dans l'eau d'alimentation de la ville de

Liège ¹. Miquel n'a presque jamais trouvé ce bacille dans les eaux du Loing et du Lunain analysées en 1902 ². Il a également noté son absence complète dans certaines eaux de source ou de drains.

D'après mes constatations, un assez grand nombre d'eaux de source (bien captées et non soumises à des causes de contamination par des bétail) ne contiennent pas le *B. coli*. Il paraît donc exagéré de dire que ce microbe est un hôte *normal* des eaux.

2° *L'intestin est l'habitat naturel du bacille d'Escherich.*

Cette proposition a été contestée. Duclaux estime que l'on peut regarder toutes les eaux comme l'habitat naturel du colibacille, au même titre que le tube digestif de l'homme et des animaux ³.

Il en serait effectivement ainsi, semble-t-il : 1° si ce bacille existait dans toutes les eaux, ce qui n'est pas ; 2° s'il avait la propriété de se multiplier ou, du moins, de se conserver indéfiniment dans l'eau, ainsi qu'il le fait dans le gros intestin.

Or, suivant Freudenreich ⁴, le *B. coli*, ajouté à l'eau d'une fontaine ou de la conduite de son laboratoire additionnée ou non d'eau de l'Aar, a disparu, à plusieurs reprises, au bout de 3 jours. Percy-Frankland a constaté que sa survie ne dépasse pas 40 jours dans l'eau de la Tamise et 47 jours dans l'eau d'un lac.

J'ai repris ces essais destinés à vérifier la vitalité du *B. coli* dans les eaux.

Mélangé à de l'eau *distillée* et *stérilisée*, le bacille, prélevé avec précaution sur gélose de manière à ne pas entraîner de milieu nutritif, a disparu entre le 4^e et le 8^e jour. La numération quotidienne indique une diminution progressive des colonies :

Après l'ensemencement.....	31,200 col. par centimètre cube.
— 1 jour.....	12,650 — — — —
— 2 jours.....	3,200 — — — —
— 3 —	1,159 — — — —
— 4 —	931 — — — —
— 5 —	340 — — — —
— 6 —	60 — — — —
— 7 —	0 — — — —

1. MALVOZ, *Congrès intern. d'Hygiène*, Bruxelles, 1903.

2. MIQUEL, *loc. cit.*, p. 117.

3. DUCLAUX, Moyens d'examen des eaux potables, *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1893, p. 514.

4. FREUDENREICH, Rech. du *B. coli* dans l'eau, *Ann. de Micrographie*, 1896, p. 414.

Le résultat a été le même dans l'eau de Vanne stérilisée.

Dans l'eau de Seine stérilisée par la chaleur, sa conservation est plus prolongée. Exposé à la lumière ou à l'obscurité, il se multiplie pendant les premiers jours, à cause des matériaux nutritifs qui existent dans cette eau, et on le retrouve encore vivant après 52 jours. L'eau de Seine stérilisée par la filtration donne des résultats semblables.

Mais il est évident que de telles conditions sont artificielles parce qu'elles favorisent la conservation du bacille dans une eau chimiquement impure mais stérile, et qu'elles suppriment la concurrence des autres bactéries, toujours nombreuses dans les eaux souillées.

J'ai donc ajouté, à de fréquentes reprises, du colibacille prélevé sur pomme de terre ou sur gélose à de l'eau *naturelle* de l'Oise, de la Marne, de la Seine. Dans ces conditions, le bacille disparaît au bout de 6 à 18 jours. Voici le résultat de la numération des colibacilles sur agar phéniqué à 0,50 0/00 dans une eau de Seine additionnée de ce microbe :

Après l'ensemencement.....	44,000	col. par centimètre cube.		
— 1 jour.....	27,000	—	—	—
— 2 jours.....	18,660	—	—	—
— 3 —.....	1,950	—	—	—
— 4 —.....	1,320	—	—	—
— 5 —.....	118	—	—	—
— 6 —.....	40 ?	—	—	—
— 7 —.....	0	—	—	—

Si, dans cette eau de Seine où le *B. coli* a ainsi spontanément disparu, on ajoute, de nouveau, du *B. coli*, celui-ci n'est plus décelable au bout de 2 ou 3 jours. Il semble donc que la mort du microbe résulte non seulement de la concurrence vitale des autres bactéries renfermées dans l'eau, mais encore d'une sorte de « vaccination » de cette eau. Enfin, on pourrait penser qu'elle est aussi la conséquence de l'épuisement des matières nutritives contenues dans cette eau, car lorsque, après une première végétation du *B. coli* et la disparition de celui-ci, on ajoute quelques gouttes de bouillon en même temps qu'un peu de *B. coli* neuf, ce dernier survit pendant 8 à 10 jours environ dans le liquide qui devient rapidement trouble, à la température du laboratoire.

Quoi qu'il en soit, on peut déduire de ce qui précède que le *B. coli* ne paraît pas vivre, le plus souvent, dans les eaux, au

delà de 1 à 2 semaines ; exceptionnellement il y persiste plus longtemps. A coup sûr, il ne s'y multiplie que dans de rares circonstances.

L'eau n'est donc pas l'asile habituel de ce microbe. C'est le sol et c'est *surtout* l'intestin de l'homme et des animaux où il est constant, qui sont, par excellence, ses habitats naturels.

La présence du *B. coli* dans une eau destinée à l'alimentation ne doit donc pas toujours être considérée comme un fait banal ou indifférent. C'est ce qui ressortira davantage, sans doute, de ce qui va suivre.

III

Rapport du nombre des B. coli contenus dans une eau avec le degré de souillure de celle-ci.

L'analyse bactériologique des eaux a pour objet la détermination de leur qualité microbienne et la recherche des bactéries pathogènes qu'elles peuvent renfermer. Mais l'isolement de la plupart de ces dernières, notamment du bacille typhique et du bacille dysentérique, est entouré, dans la pratique, des plus grandes difficultés. On est donc conduit, en conséquence, à s'appuyer sur d'autres éléments d'appréciation, parmi lesquels la recherche et la détermination quantitative du colibacille me paraissent mériter de retenir spécialement l'attention.

Un principe analogue a été, du reste, admis également par Petruschky et Pusch, dans un important mémoire paru il y a un an¹. Pour ces auteurs, il est utile de rechercher la présence et de spécifier l'abondance du bacille du côlon dans les eaux².

Le *B. coli* n'apporte, évidemment, par lui-même aucun élément dangereux puisqu'il existe normalement dans notre tube digestif. Il n'a donc que la valeur d'un *test* indiquant le degré de pureté ou d'altération des eaux de boisson.

La difficulté d'appréciation d'une eau qui contient le *B. coli* a été signalée par maints auteurs, notamment par Grimbart, Löffler, Malvoz, au Congrès d'Hygiène de 1903. Elle provient, en réalité, de ce que le colibacille n'est pas revêtu, dans les

1. PETRUSCHKY et H. PUSCH, *Zeitschr. f. Hyg.*, t. XLIII, fasc. 2, p. 304.

2. Il me sera permis, à ce propos, de faire remarquer que j'applique cette règle d'analyse, à savoir le dénombrement du colibacille dans les eaux, depuis environ quinze ans. Il en sera, du reste, fourni des preuves et des exemples dans le cours de ce travail.

eaux, de sa marque d'origine. En d'autres termes, sa constatation ne suffit pas à faire reconnaître si ce microbe provient directement de l'intestin. A la vérité, il n'existe aucun moyen de faire cette différenciation ni de juger si une eau qui le renferme l'a reçu des matières fécales, ou bien d'une origine plus banale telle que le sol non cultivé ou l'air.

Cependant Lévy et Bruns ont pensé qu'on pouvait fonder un diagnostic d'origine sur la *virulence* du microbe. De même, Blachstein a recommandé de faire l'inoculation intrapéritonéale des bacilles extraits de l'eau : lorsque ce microbe est virulent, il y aurait lieu de le tenir pour suspect.

On sait, cependant, que le *B. coli* extrait des matières fécales est fréquemment peu ou pas virulent. Ayant, néanmoins, extrait un grand nombre d'échantillons de colibacilles d'eaux de diverses natures, je les ai inoculés sous la peau de cobayes. Or, il n'a paru y avoir aucune relation entre le degré d'adultération de ces eaux, révélé par les cultures, et la virulence du *B. coli* qui en a été isolé. Telle eau, très souillée, a donné du colibacille avirulent ; telle autre, également riche en germes, possédait un bacille mortel pour le cobaye. Enfin certaines eaux de source, bien que pures, renfermaient un *B. coli* qui tuait les animaux. Aucune conclusion invariable ne peut donc être tirée des inoculations.

J'ajouterai que les caractères des microbes, leur réaction plus ou moins acide, les particularités de leurs cultures, etc., n'ont pas davantage permis de délinier si un *B. coli* appartient à une eau très souillée ou non, s'il a, ou non, une origine fécale.

Cependant les nombreuses analyses d'eau que j'ai été appelé à faire m'ont confirmé l'importance que présente la constatation de ce microbe. Pour bien saisir cette importance, il suffit de rappeler les conditions dans lesquelles s'opère naturellement l'infection des eaux potables, soit par le déversement direct ou indirect de matières fécales, d'engrais humain, de fumier, de purin, etc. ; — soit par celui de parcelles de terre peu souillées ou par des poussières venues de l'air.

Dans le premier cas, le bacille venu de l'intestin de l'homme ou des animaux, et retrouvé dans les eaux de boisson, présente une double particularité : il y est apporté en grande quantité ; et il est accompagné des microbes satellites que l'on rencontre

habituellement dans les déjections et les matières organiques en putréfaction.

Au contraire, dans le second cas, c'est-à-dire lorsque l'eau a reçu des poussières ou des débris de terre non cultivée, le colibacille n'y existe qu'en proportion toujours faible ou insignifiante.

La quantité de colibacilles contenus dans une eau est donc en rapport avec la nature de sa souillure. Par conséquent, l'analyse bactériologique des eaux doit se préoccuper moins de la présence pure et simple du *B. coli* que de l'abondance plus ou moins grande de ce microbe dans l'eauensemencée.

La constatation des microbes habituellement associés, dans les matières fécales, à ce bacille, ou leur absence, viendra confirmer ou infirmer la valeur que l'on doit, pratiquement, attribuer à sa présence.

*
* *

Il est deux points essentiels que je vais maintenant essayer de démontrer :

1^o Les eaux *souillées* renferment le colibacille en proportion élevée ;

2^o Lorsque ce microbe existe dans les eaux *pures*, on ne l'y trouve qu'en très minime quantité.

Quelques exemples vont venir à leur appui. A la date du 26 décembre 1891, un échantillon d'eau provenant d'une nouvelle source qu'on destinait à l'alimentation de Cherchell (Algérie) me fut envoyé par la municipalité de cette ville, pour être soumis à l'analyse. Le nombre des germes aérobies contenus dans cette eau était de 19,500 par c. c. La teneur en colibacilles était de 30 par c. c., soit 30,000 par litre. L'eau était donc très riche, à la fois en bactéries vulgaires et en bacilles du colon. Pour cette dernière raison, je conclus qu'elle était de qualité dangereuse et qu'elle était vraisemblablement souillée par les matières fécales : l'enquête justifia entièrement cette dernière présomption.

Il me serait facile de multiplier les exemples identiques. Les eaux d'Orléansville, de Tlemcen, de Médéa, de Blida, d'Alger, etc., analysées à la même époque, ont témoigné de la relation étroite qui existait entre le *nombre* des colibacilles et l'origine fécale de l'adultération de ces eaux : infection par des lavoirs, des fumiers, des déjections humaines entraînées par la

pluie dans les regards des conduites d'eau, ou bien dans des réservoirs situés au pied d'un tertre, etc.

Voici, sous forme de tableau, le résultat d'examens bactériologiques plus récents pratiqués sur quelques eaux de Paris ou de villes différentes ; je n'en cite intentionnellement que quelques-uns pour ne point allonger à l'excès ce travail.

Origine de l'eau.	Date du prélèvement.	Nombre de bact. aérobie par cent. cube.	Nombre de <i>B. coli</i> par centimètre cube.
1 ^o Eau de Seine :			
Pont Saint-Michel ...	15 mars 1899	4,320	4
Pont d'Arcole	21 — —	5,200	4
— — —	20 avril —	5,360	8
Courbevoie.....	26 oct. 1903	30,000	25
— — —	1 ^{er} juill. 1904	46,000	50
— — —	20 — —	28,500	45
Ivry	1903	5,600	60
— — —	1904	15,000	50
Maisons-Laffitte	1903	1,925	10
Val-de-Grâce.....	20 déc. 1904	1,038	1
2 ^o Eau de l'Oureq.....	1903	12,000	75
3 ^o Eau de Coulommiers	6 nov. 1903	16,000	15
4 ^o Eau de puits (Rambouillet)	11 nov. 1903	2,200	3
5 ^o Eau de puits (Coulommiers)	6 nov. 1903	4,000	3
6 ^o Puits à Brest.....	18 oct. 1903	5,600	75
7 ^o Puits à Maubeuge.....	19 nov. 1903	5,000	25
8 ^o — — —	— — —	8,600	80
9 ^o — à Ivry.....	déc. 1903	1,800 liq. rapide	50
10 ^o — à Issy.....	13 janv. 1904	10,500	110

On peut remarquer que toutes les eaux ci-dessus renferment une proportion souvent considérable de bactéries et que le *B. coli* est lui-même, parfois, extrêmement abondant. Il n'y a pas, d'une manière constante, proportionnalité absolue entre le chiffre global des microbes des eaux et celui des colonies colibacillaires. Mais dans toutes, la proportion des exemplaires du *B. coli* est égale ou supérieure à 1 par c. c.

Dans beaucoup de cas, du reste, il existe un rapport direct entre le degré d'adultération microbienne de l'eau et le nombre des colibacilles qu'elle contient. J'ai pu constater parfois, en analysant systématiquement une même eau soumise à des variations dans sa souillure, que le nombre des *B. coli* suit une marche parallèle à celle des autres bactéries. L'eau de la nappe souterraine d'un camp, près d'Alger, dans lequel avait régné la fièvre typhoïde pendant les années précédentes, fut analysée en 1891. Elle renfermait, par centimètre cube :

Avant l'arrivée des troupes.....	200 bact.	et 0 <i>B. coli</i> .
6 jours après leur arrivée.....	770 —	0 —
14 — — —	4,240 —	1 —
41 — — —	6,960 —	2 —
60 — — —	14,900 —	10 —

Le sol sablonneux, très perméable, avait laissé progressivement filtrer, dans la nappe aquifère, les germes déposés à sa surface, ce qui explique la pénétration simultanée du *Bac. coli* et des autres bactéries apportées par les matières fécales des hommes et des animaux.

*
* *

Il nous faut, maintenant, comparer les constatations qui précèdent à celles que donne l'analyse des eaux très pauvres en germes vulgaires et qui doivent, par là même, être rangées parmi les eaux de bonne qualité. Le *B. coli* s'y trouve-t-il avec une fréquence égale à celle qu'il a dans les eaux souillées?

Ainsi qu'on l'a vu, l'analyse est loin de montrer, d'une manière constante, la présence du colibacille dans toutes les eaux. Je ne l'ai jamais trouvé dans les eaux d'une pureté incontestable.

Ici se place une remarque. La facile recherche du bacille d'Escherich fait parfois négliger de poursuivre jusqu'au bout les essais destinés à fixer la nature du microbe rencontré. Il importe expressément de soumettre le bacille isolé à toutes les épreuves de coloration et de culture propres à l'identifier. Peut-être sa constatation deviendra-t-elle moins fréquente.

Quoi qu'il en soit, il paraît exister une véritable corrélation entre la rareté extrême du *B. coli*, dans une eau, et le degré de pureté de celle-ci. Alors que, pour les eaux très souillées, on trouve plusieurs exemplaires de ce microbe par centimètre cube (5, 10, 20, etc., et jusqu'à 50 et davantage), au contraire, pour les eaux de moins mauvaise qualité, il est nécessaire d'ensemencer $1/2$, 1 c. c., pour obtenir le même microbe. Dans les eaux à faible teneur bactérienne, ce n'est plus 1 c. c., mais 10 c. c., 50 c. c., 100 c. c., 200 c. c., etc., qu'il faut ensemen- cer pour avoir un résultat positif.

Le *B. coli* n'existe donc, dans les eaux pures (lorsqu'il s'y trouve) qu'à un degré de dilution extrême, et nullement com-

parable à son abondance dans les eaux malsaines ou simplement suspectes, contaminées par les déjections, les eaux de lavoir, les eaux de pluie écoulées de terrains cultivés, etc.

Le parallèle entre l'eau de la Vanne et l'eau de Seine récoltées les mêmes jours, au laboratoire du Val-de-Grâce, montrera combien la différence est sensible. Ces examens ont été faits pendant les années 1899, 1903 et 1904. La numération générale des bactéries a été faite par la méthode de culture sur plaques de gélatine. Le dénombrement des colibacilles a été opéré ainsi qu'il sera dit plus loin :

	Nombre des bactéries par cent. cube.	Nombre des <i>B. coli</i> .
I. { Seine.....	8,940	4.000 par litre.
{ Vanne.....	410	1 dans 40 c. c. d'eau.
II. { Seine.....	3,290	2.500 par litre.
{ Vanne.....	210	1 dans 50 c. c. d'eau.
III. { Seine.....	2,960	500 par litre.
{ Vanne.....	72	1 dans 100 c. c. d'eau.
IV. { Seine.....	2,290	4.000 par litre.
{ Vanne.....	280	1 dans 30 c. c. d'eau.
V. { Seine.....	9,300	6.000 par litre.
{ Vanne.....	590	1 dans 40 c. c. d'eau.
VI. { Seine.....	2,638	560 par litre.
{ Vanne.....	220	1 dans 20 c. c. d'eau.

IV

Il nous faut, maintenant, indiquer, aussi approximativement que possible, les conclusions que l'on peut tirer du dénombrement des colibacilles des eaux. Quelle est la proportion de ce microbe compatible avec une bonne qualité de l'eau? Quelle est la limite au-dessus de laquelle celle-ci est mauvaise, au-dessous de laquelle elle est potable?

Aucun doute n'est possible lorsque les eaux renferment un chiffre très élevé de *B. coli*: si l'analyse y décèle, par centimètre cube, 10 à 50 colibacilles par exemple, ou davantage, elle ne peut être considérée que comme très contaminée. Par contre, une eau dont il faut ensemercer plusieurs centaines de centimètres cubes pour obtenir une culture du *B. coli* doit être presque toujours regardée comme pure.

L'estimation devient plus difficile pour les doses intermédiaires, en deçà ou delà desquelles l'eau appartient à la catégorie des eaux assez pures, aussi bien qu'assez souillées. En pareille occurrence, il va sans dire que l'expertise doit conclure, au moins, à la qualité douteuse de cette eau. Je vais essayer de donner cette évaluation, d'après l'étude comparée des résultats des analyses que j'ai faites.

NOMBRE DE COLONIES du <i>B. coli</i> .		SIGNIFICATION
par cent. cube.	par lit. d'eau.	
10 à 50 et plus..	Eau profondément souillée par les matières fécales. Dangereuse pour la boisson (eaux d'égouts, eaux de rivières).
1 à 10.....	Eau mauvaise ou très mauvaise. Impropre à la boisson (eau de rivière, eau de puits contaminés, etc.).
	100 à 1.000.	Eau suspecte tantôt en période d'infection, tantôt au début ou au déclin d'une contamination plus grande.
	50 à 100...	Eau passable ou médiocre. A surveiller.
	10 à 50....	Eau d'assez bonne ou de bonne qualité.
	0.....	Eau pure ou très pure.

Dans le tableau qui précède, je n'entends nullement conclure que la valeur bactériologique d'une eau de boisson doit être appuyée exclusivement sur sa teneur en colibacilles. Mais j'estime, après une certaine expérience de la question, que *la teneur en B. coli doit compter comme un élément très important d'appréciation d'une eau* et, s'il y a doute, qu'elle doit aider à trancher la question soit dans un sens, soit dans un autre.

Il est donc d'une très haute utilité de rechercher et de doser le B. coli dans les eaux de boisson soumises à l'expertise.

*
* *

La technique de l'isolement et du dénombrement du colibacille est assez simple : c'est celle que j'ai recommandée depuis longtemps. Elle me paraît toujours être la plus pratique et la plus efficace.

Dans un certain nombre de tubes de bouillon phéniqué à 0,75 0/00, on ajoute, à l'aide d'une pipette exactement jaugée, 1,

2, 5, 10, 15, 20, etc., gouttes de l'eau à examiner. Pour les quantités d'eau plus considérables, on emploie des fioles de Vivien d'une contenance de 100 à 300 c. c.; on y verse, en proportion égale, du bouillon et la quantité d'eau à ensemençer. La solution phéniquée à 5 0/0 (1 goutte pour 2 c. c. du mélange) est ajoutée ensuite au mélange d'eau et de bouillon.

On agite et on porte à l'étuve à 41°. On examine 12 à 18 heures après. Les tubes ou les ballons restés clairs ne renferment par le *B. coli*. Ceux qui se sont nettement troublés peuvent le renfermer. On fait subir à ces dernières cultures, s'il est nécessaire, un deuxième passage en bouillon phéniqué à la température de 41° et on ensemeince dans les milieux usuels (lait tournesolé, bouillon lactosé carbonaté, bouillon lactosé au rouge neutre, etc.).

Supposons qu'un tube contenant 1 c. c. d'eau ait donné le *B. coli* et que les tubes ensemençés avec une quantité moindre ne se soient pas troublés, on pourra admettre, avec une certaine approximation, que le bacille existe, à l'état d'unité, dans 1 c. c. d'eau.

Il est facile de comprendre qu'avec une pipette d'ensemencement jaugeant 30, 40, 50 gouttes au centimètre cube, on peut arriver à une évaluation exacte du nombre des *B. coli* contenus dans chaque centimètre cube d'eau.

Dans la pratique, ces opérations se font avec une grande rapidité. J'insiste, de nouveau, sur la nécessité qu'il y a de contrôler rigoureusement la nature du bacille isolé. Il ne faut pas oublier, en effet, que certains autres microbes peuvent se développer en bouillon phéniqué, à la température de 41° : *B. subtilis*, *B. mesentericus vulg.*, streptocoque court, gros diplocoque à colonies blanches, bacille pyocyanique, quelques rares bacilles prenant le Gram ou liquéfiant la gélatine Macé¹. a signalé aussi le bacille rouge de Globig et un microcoque dont la culture sur pomme de terre ressemble à celle du bacille typhique. Ces diverses espèces sont, du reste, faciles à identifier et, pour la plupart, troublent le bouillon phéniqué moins que le *B. coli*.

1. MACÉ, *Traité prat. de Bactériologie*, 4^e édition, p. 1125.

V

Importance des microbes satellites du B. coli.

Quelle que soit l'origine du colibacille contenu dans les eaux, celui-ci n'y est jamais apporté seul. Outre que le bacille typhique peut coexister avec lui, lorsqu'il y a contamination spécifique (mais on sait la difficulté extrême que présente encore l'isolement du bacille d'Eberth dans les eaux), il existe, en même temps que le bacille du côlon, un certain nombre de microbes satellites de ce dernier : ce sont les microbes des matières fécales, ceux des urines fermentées, ceux des substances organiques soumises à la putréfaction, ceux des fumiers, etc...

L'importance de la constatation de cette flore microbienne, en même temps que celle du *B. coli*, est très grande; la présence simultanée du *B. coli* et des microbes de la putréfaction a une valeur tout à fait décisive.

On sait que Petruschky et Pusch¹ attachent un intérêt spécial à la constatation, dans les eaux, des bactéries thermophiles, c'est-à-dire susceptibles de se développer à 38° et plus. Il est vrai que beaucoup d'eaux contaminées renferment quelques-uns de ces microbes. Toutefois, l'importance qui leur est attribuée ne saurait être que relative, car ils ne sont pas aussi constants, dans ces eaux, que le *B. coli*. D'un autre côté, sauf les bacilles du genre *Proteus* et quelques autres rares bactéries de la putréfaction qui poussent bien à 38°, la recherche exclusive des thermophiles a l'inconvénient de laisser de côté les microbes usuels de la putréfaction et de la fermentation ammoniacale, dont la température eugénésique est comprise entre 15° et 25°, et qui offrent, d'autre part, une signification importante (*B. fluorescents* liquéfiant et non liquéfiant, *B. termo*, *B. janthinus*, etc.). Il faut ajouter les espèces *spirillaires*, très communes dans les eaux souillées par les matières fécales.

A côté des espèces spéciales à la putréfaction, il est également un autre groupe de microbes qui accompagnent aussi le *B. coli* et sont les commensaux habituels du tube digestif de l'homme et des animaux : ce sont les *microbes anaérobies*.

1. *Loc. cit.*

Jusqu'ici, l'étude bactériologique des eaux, en négligeant la recherche de ces bactéries, s'est privée d'un élément d'appréciation d'un réel intérêt.

Les eaux adultérées diffèrent, en effet, sensiblement, à cet égard, des eaux pures. Alors que, dans ces dernières, le nombre des germes anaérobies *stricts* (les anaérobies facultatifs étant laissés de côté) est extrêmement rare, au contraire, les eaux soumises aux infiltrations de matières fécales, de fumiers, de purin, de substances organiques végétales ou animales en putréfaction, *renferment une quantité beaucoup plus élevée de microbes anaérobies*. Dans les premières, leur nombre s'élève au plus à quelques unités par centimètre cube; parfois ce chiffre peut, même, être nul. L'ensemencement des eaux contaminées donne, par contre, 5, 10, 20, 50, germes anaérobies par centimètre cube. Leur proportion est en raison directe du nombre des aérobie, mais toujours, cependant, beaucoup plus faible. Ce serait sortir du cadre de ce travail que de m'étendre davantage sur ce dernier ordre de recherches. Je me propose, du reste, d'y revenir prochainement.

Il ne faut donc pas séparer, dans l'expertise bactériologique des eaux, les divers éléments d'appréciation que l'on peut tirer à la fois du nombre des *B. coli* qu'elles renferment; de la présence des microbes de la putréfaction; enfin, de celle des bactéries anaérobies strictes, toujours d'autant plus nombreuses que l'eau est plus adultérée. Il y a très rarement contradiction dans les résultats donnés par cette triple recherche: personnellement, je n'en ai jamais constaté.

Le témoignage fourni par la présence du colibacille et par son degré plus ou moins grand d'abondance est surtout précieux pour les eaux d'apparence peu souillées. Sa valeur s'affirme, en particulier, dans l'examen des eaux à composition microbienne très instable, tantôt pures, tantôt contaminées, telles que certaines eaux de source, les eaux de drainage, etc. En mettant en évidence une proportion relativement élevée de colibacilles, la recherche de ces microbes permet de préciser la formule d'appréciation de ces eaux et de considérer comme suspectes, mauvaises ou dangereuses certaines eaux de boisson que le nombre seul de leurs germes eût fait ranger, dans la classification de Miquel, parmi les eaux bonnes, assez bonnes ou passables. La présence

simultanée de quelques microbes de la putréfaction et de spirilles dans les cultures sur plaques, et celle des bactéries anaérobies apportent un appoint important à l'appréciation de ces eaux et permettent souvent d'annoncer le début ou le déclin d'une pollution plus considérable. Cet ensemble de constatations implique, en même temps, la nécessité de pratiquer une enquête et d'effectuer des examens répétés de l'eau, notamment après une période de pluie. Une pareille méthode d'étude et, spécialement, la détermination quantitative des *B. coli* contenus dans les eaux d'alimentation de la ville d'Alger m'ont permis de prévoir, au mois de mai 1895, une épidémie de fièvre typhoïde qui s'est effectivement répandue, dans toute la ville, quinze à vingt jours après, mais a été de courte durée, la distribution d'eau infectée ayant été immédiatement suspendue.

D'une manière inverse, il arrive assez souvent que le nombre élevé des germes observés dans une eau résulte de la multiplication pure et simple, dans un réservoir, de bactéries banales et sans signification suspecte. Dans les casernes ou les collectivités alimentées en eau stérilisée par la filtration ou par la chaleur, cette eau, reçue dans des cruches, s'enrichit de bactéries venues de l'air et des parois des récipients : ces microbes s'y multiplient artificiellement et leur nombre peut atteindre très vite 10,000, 20,000 par c. c. et davantage, surtout en été. L'eau stérilisée se trouve ainsi plus riche en bactéries que l'eau non stérilisée ! L'expert peut, dès lors, être fort embarrassé pour formuler son opinion : s'il fonde celle-ci sur le nombre absolu des germes, il est obligé de déclarer cette eau de mauvaise qualité, alors qu'elle ne renferme que des espèces microbiennes absolument inoffensives. L'absence de *B. coli* lui fournira un élément d'appréciation plus exact. La recherche des microbes de la putréfaction et des germes anaérobies confirmera les conclusions de son expertise.

Aussi ne puis-je que m'élever contre l'opinion émise par Löffler, d'après lequel « on ne peut juger de la valeur d'une eau d'après le nombre ou l'espèce des germes ». D'après ce savant, « des méthodes spéciales permettant seulement de déceler le *B. coli* ou les bacilles de la putréfaction ne sont pas nécessaires ¹ ».

1. LÖFFLER, *Rapport au Congrès international d'Hygiène*, Bruxelles, 1903.

Bien conduite, l'analyse bactériologique donne, au contraire, des renseignements d'une haute valeur sur la qualité des eaux. Parmi les épreuves longues, difficiles et minutieuses que nécessite cette analyse, la détermination numérique du *B. coli*, la recherche des microbes de la putréfaction et celle des anaérobies, revendiquent, aussi bien que la classique numération des bactéries, une place extrêmement importante. Il en sera toujours ainsi, même alors que nous posséderons des méthodes sûres d'isolement des microbes pathogènes dans l'eau, et, notamment, du bacille typhique. C'est grâce à ces analyses que l'on peut contrôler l'efficacité d'épuration des eaux; ce sont elles encore qui ont permis, dans un nombre imposant de cas, d'améliorer l'état sanitaire des cités et de prévenir ou d'arrêter certaines épidémies parmi lesquelles la fièvre typhoïde est la plus commune et la plus redoutable.

DE LA VALEUR THÉRAPEUTIQUE DE L'ANTITOXINE

DANS LE SÉRUM ANTIDIPHTÉRIQUE

PAR L. CRUVEILHIER

(Travail du laboratoire de M. Roux.)

On a signalé dans le sérum antidiphtérique, outre l'antitoxine proprement dite, une agglutinine¹, une sensibilisatrice² et d'autres substances encore mal connues et désignées sous les noms de « préventives » ou d'« antimicrobiennes ».

Il est permis de se demander si ces substances sont totalement étrangères à l'action thérapeutique des sérums et si « le sérum indiqué comme le plus riche en antitoxine est bien celui qui guérit le mieux la diphtérie chez l'homme et chez les animaux ».

Les expériences rapportées par M. Roux au congrès de 1900 et celles de MM. L. Martin et L. Momont, ainsi que les résultats obtenus par M. Marfan dans son service d'hôpital, semblent prouver que le sérum le plus efficace n'est pas toujours celui qui contient le plus d'antitoxine.

A notre tour, nous avons demandé à des expériences la solution de cette question.

A cet effet, nous avons employé comparativement des sérums mesurant un nombre différent d'unités antitoxiques.

Toutes nos expériences ont été faites sur le même animal, le cobaye, et constamment nous nous sommes servi de sujets neufs dont le poids variait de 300 à 400 grammes.

Nous avons examiné l'effet utile de ces sérums d'abord au point de vue préventif, puis nous avons essayé leur pouvoir curatif.

1. NICOLAS, *Société de Biologie*, 1898-1900.

2. L. MARTIN, *Société de Biologie*, mai 1903.

I

ESSAIS PRÉVENTIFS

A. Dans une première série d'expériences, nous avons comparé un sérum du commerce titrant 500 unités avec un sérum d'une autre marque ne contenant que 200 unités antitoxiques. Nos cobayes recevaient une quantité de sérum proportionnelle à leur poids respectif et, 24 heures après, on leur inoculait sous la peau 3/10 de c. c. de culture en bouillon de bacille diphtérique n° 261.

Dans ces conditions, nous avons observé que le pouvoir préventif d'un sérum n'est pas toujours en rapport avec sa puissance antitoxique.

C'est ainsi que dans quatre de nos expériences, les cobayes qui avaient reçu préventivement 1/250.000 de leur poids du sérum de 200 unités ont résisté, tandis que les animaux auxquels on avait injecté la même quantité du sérum titrant 500 unités ont succombé.

Toutefois, au cours de deux interventions, les deux sérums nous ont donné des résultats semblables et, dans une septième expérience, le cobaye qui avait reçu 1/250.000 de son poids de sérum de 500 unités antitoxiques a résisté, tandis que celui qui avait reçu la même quantité de sérum de 200 unités est mort.

B. Dans deux essais préventifs nous avons comparé le sérum de 500 unités antitoxiques avec un sérum provenant d'un cheval n'ayant pas tenu à 50, que nous devons à l'obligeance de M. le docteur Momont, et qui avait servi aux essais pratiqués par M. le docteur Marfan dans son service d'hôpital — en 1900. — Dans les deux cas, nous avons pu intervenir utilement en injectant aux cobayes 1/250.000 de leur poids de ce sérum; le sérum de 500 unités à cette dose ne nous a pas permis de sauver nos animaux.

C. Dans quatre nouvelles expériences nous avons recherché si le sérum de 200 unités garde sa supériorité sur le sérum titrant 500 unités antitoxiques, quand on substitue au bacille diphtérique n° 261 un autre microbe tel que le bacille diphtérique CC, que nous devons à l'obligeance de M. le docteur Momont.

Dans trois expériences l'action des deux sérums a été semblable, tandis qu'au cours d'une quatrième intervention le sérum titrant 200 unités s'est montré actif, alors que le sérum de 500 unités avait cessé de l'être.

D. Dans trois essais nous avons employé, pour déterminer la diphtérie chez nos animaux, un microbe retiré de la gorge d'un petit malade de l'hôpital Pasteur et que nous devons à l'obligeance de M. le docteur Girard.

Ici encore, les résultats de l'expérience nous ont montré que l'efficacité du sérum de 200 unités n'était nullement due à une élection particulière pour le microbe employé, mais était générale.

Dans trois expériences, en effet, le sérum de 200 unités, préventif à $1/250,000$, s'est montré supérieur au sérum de 500 unités, préventif seulement à $1/200,000$.

E. Les sérums que nous avons comparés dans les expériences précédentes provenaient d'animaux différents.

Il nous a semblé intéressant de comparer entre eux deux sérums tirés du même cheval, mais ayant un pouvoir antitoxique différent. La différence dans le nombre des unités antitoxique tenait au laps de temps écoulé entre la dernière injection de toxine et la saignée.

M. le docteur Momont a bien voulu nous donner deux sérums provenant du même cheval, titrant l'un 300 unités et l'autre 500 unités¹.

Le résultat obtenu par la comparaison de ces sérums nous a montré que le maximum de pouvoir antitoxique ne correspondait pas toujours avec le maximum de pouvoir préventif. Le sérum du cheval en question, en effet, alors qu'il ne contenait plus que 300 unités antitoxiques, était encore préventif à $1/200,000$, c'est-à-dire au même titre qu'au moment où il renfermait 500 unités.

II

ESSAIS CURATIFS

A. Dans nos premiers essais curatifs, pour donner la diphtérie à nos animaux, nous avons eu recours au bacille diphtérique

1. Huit jours après la dernière injection de toxine, le cheval dont il s'agit fournissait un sérum titrant 500 U.; quinze jours après, le même cheval donnait un sérum titrant seulement 300 U.

n° 261 cultivé sur gélose dépourvue d'eau de condensation. Nous avons prélevé une quantité telle de culture fraîche (1/4 de tube), que nos animaux témoins sont morts entre 36 et 48 heures. Ils présentaient à l'autopsie les lésions caractéristiques de la diphtérie.

Les cobayes, après inoculation, ont été répartis en deux lots égaux : à chacun des animaux du 1^{er} lot nous avons injecté sous la peau, à partir de la deuxième jusqu'à la seizième heure, 1/10 de c. c. de sérum de 200 unités — soit 20 unités.

Les cobayes du second lot ont reçu la même dose de sérum sous la peau, comme précédemment, mais nous avons eu recours, cette fois, à un sérum titrant 500 unités. Chaque cobaye recevait donc 50 unités antitoxiques.

Ces expériences, qui ont porté sur un grand nombre de cobayes, tous approximativement du même poids, nous ont montré qu'à volume égal, « certains sérums très antitoxiques guérissent moins bien les cobayes inoculés avec une culture de bacille diphtérique que d'autres qui renferment moins d'antitoxine ». Une seule fois, en effet, le sérum de 500 unités s'est montré plus efficace que le sérum de 200 unités, tandis qu'au cours de trois expériences les animaux traités par le sérum titrant 200 unités ont résisté, alors que ceux qui avaient reçu du sérum de 500 unités sont morts. Au cours de trois interventions, enfin, les deux sérums nous ont paru avoir la même efficacité.

B. Dans les expériences précédentes, pour donner la diphtérie à nos cobayes, nous nous étions servi constamment du bacille diphtérique n° 261. Il nous a paru intéressant de faire une nouvelle série d'essais avec un autre bacille diphtérique. Nous avons eu recours au bacille diphtérique CC en culture fraîche sur gélose, et déjà essayé préventivement. Nous avons employé des quantités telles que nos animaux témoins ont succombé entre 40 et 48 heures.

De ces expériences, il est résulté que le sérum à 200 unités s'est montré plus efficace que le sérum à 500 unités, non seulement à l'égard du bacille diphtérique n° 261, mais aussi vis-à-vis du bacille diphtérique CC. Cette supériorité du sérum à 200 n'est toutefois pas considérable quand on emploie une même quantité des deux sérums. Dans un seul cas, en effet, nous avons

pu intervenir utilement à l'aide du sérum de 200 unités, alors qu'une même quantité de sérum titrant 500 unités s'est montrée inefficace. Au cours des trois autres essais que nous avons pratiqués, les deux sérums nous ont permis l'un et l'autre d'intervenir 10 heures après l'inoculation de la diphtérie.

C. Dans quatre nouvelles expériences, pour produire la diphtérie chez nos animaux, nous avons eu recours au microbe retiré de la gorge d'un jeune enfant soigné à l'hôpital Pasteur, avec lequel nous avons déjà pratiqué des essais préventifs. Ce microbe, qui poussait dans le bouillon sans y produire de voile, mais en le troublant abondamment, tuait les cobayes en 48-60 heures, à la dose de 1/4 de tube de culture sur gélose vieille de 24 heures. 10 heures après l'inoculation de ce bacille diphtérique, il nous a été possible de sauver tous les animaux en expérience, aussi bien à l'aide du sérum de 200 unités antitoxiques qu'avec le sérum de 500 unités. Quel que soit le microbe employé, à volume égal les sérums de 200 unités antitoxiques et de 500 unités permettent donc d'obtenir des résultats dont l'écart, peu important, se produit presque toujours en faveur du sérum le moins riche en antitoxine.

Ainsi 20 unités antitoxiques du sérum de 200 unités nous ont donné de meilleurs résultats que 50 unités du sérum titrant 500 unités.

D. Nous avons pratiqué trois nouvelles expériences afin de comparer l'efficacité des deux sérums provenant du même cheval, mais titrant un nombre différent d'unités, déjà essayés préventivement.

Or, ces deux sérums se sont encore montrés efficaces 10 heures après l'inoculation de la diphtérie à la dose de 1/10 de c. c.; 30 unités du sérum le moins riche en antitoxine nous ont même permis d'intervenir dans un cas, 12 heures après l'inoculation, alors que 50 unités du sérum titrant 500 unités n'avaient réussi qu'à retarder la mort de l'animal.

E. Les divers sérums précédemment étudiés employés à volume égal, soit à la dose 1/10 de c. c.¹, nous ont toujours permis d'intervenir utilement 8 heures après l'inoculation de la diphtérie.

1. 1/10 de c. c. correspond à 20 unités de sérum de 200, 30 unités de sérum de 300, 50 unités de sérum de 500.

Dans de nouveaux essais, nous avons cherché à établir si le nombre d'unités antitoxiques nécessaires pour sauver de la diphtérie des cobayes inoculés depuis 8 heures, variait avec le titre d'antitoxine du sérum employé. Pour ces essais, nous avons eu recours aux deux sérums provenant du même cheval, déjà étudiés dont l'un mesurait 500 et l'autre 300 unités.

Au cours de six expériences, 25 unités antitoxiques du sérum de 300 (soit $1/12$ de c. c.), nous ont permis constamment d'intervenir *avec efficacité*, tandis que pour obtenir le même effet utile à l'aide du sérum de 500 unités, il nous a fallu employer une quantité presque double d'antitoxine, soit 40 unités ($1/12$ de c. c.).

Dans les mêmes expériences, pour obtenir la survie définitive, sans escarre, des cobayes traités 8 heures après l'inoculation, il a fallu employer une quantité de sérum à 500 unités correspondant à 40 unités, et des quantités de sérum de 300 renfermant seulement 25 unités antitoxiques.

40 unités du sérum le plus riche en antitoxine n'ont donc pas eu plus d'efficacité que 25 unités du sérum de 300 unités.

Ainsi, dans l'évaluation de la quantité de sérum que l'on doit injecter, il semble qu'il ne faille pas seulement tenir compte du nombre d'unités antitoxiques que renferme le sérum.

Les expériences précédentes nous montrent, en effet, que le sérum indiqué comme le plus riche en antitoxine n'est pas celui qui guérit le mieux la diphtérie du cobaye.

Ces deux sérums proviennent d'un même cheval, celui à 500 unités a été recueilli 8 jours et celui à 300 unités 20 jours après la dernière injection de toxine. Le pouvoir antitoxique du sérum atteint le maximum peu de jours après que la toxine a été introduite dans l'organisme du cheval immunisé, puis il va en diminuant; cependant, tout en perdant des unités antitoxiques, le sérum acquiert d'autres propriétés qui se manifestent par une action thérapeutique plus efficace du sérum fourni par une saignée plus tardive.

III

En résumé:

A. Au cours de nos essais préventifs:

1° Avant l'inoculation du bacille diphtérique n° 261 :

a) Quatre fois sur sept les animaux ayant reçu $1/250,000^e$ de leur poids de sérum de 200 unités ont résisté, alors que les cobayes ayant reçu une même quantité de sérum de 500 unités avaient succombé;

b) Une fois, il est vrai, le sérum de 500 unités s'est montré supérieur à celui de 200 unités;

c) Deux fois les résultats obtenus par l'emploi de l'un ou l'autre des deux sérums ont été identiques.

2° Avant l'inoculation du bacille diphtérique n° 261 : deux fois le sérum de 50 unités nous a permis d'agir préventivement à l'aide d'une dose de sérum moindre que le sérum de 500.

3° Avant l'inoculation du bacille diphtérique CC :

a) Trois fois les sérums de 200 et de 500 unités se sont montrés préventifs à $1/250,000$;

b) Une fois le sérum de 200 unités a été efficace alors que le sérum de 500 ne l'était plus.

4° Avant l'inoculation du bacille diphtérique x : le sérum de 200 unités employé à la dose de $1/250.000$ nous a permis d'agir préventivement, tandis que le sérum de 500 n'était efficace qu'à $1/200,000$.

5° Avant l'inoculation du bacille diphtérique n° 261 : le sérum de 300 unités et celui de 500 unités, provenant tous deux du même cheval, se sont montrés aussi préventifs l'un que l'autre.

B. Au cours de nos essais curatifs :

1° Après inoculation du bacille diphtérique n° 261 suivie 10 heures après de l'injection de sérum, à la dose de $1/10$ de c. c. :

a) Trois fois le sérum de 200 unités nous a donné des résultats préférables à ceux obtenus par un même volume de sérum de 500 unités;

b) Trois fois le résultat a été le même avec les deux sérums;

c) Une fois seulement, le sérum de 500 unités s'est montré efficace. alors qu'une même quantité de sérum titrant 200 unités ne l'était plus.

2° Après inoculation du bacille diphtérique CC suivie d'injection de sérum à la dose de $1/10$ de c. c. :

a) Une fois le sérum de 200 unités antitoxiques nous a donné de meilleurs résultats qu'un même volume de sérum titrant 500 unités;

b) Trois fois nous avons obtenu le même effet utile avec l'un et l'autre sérum.

3° Après inoculation de bacille α (isolé de gorge d'enfant d'hôpital) suivie d'injection de sérum à la dose de 1/10 de c. c. : les deux sérums, comparativement expérimentés, nous ont permis de sauver nos cobayes 10 heures après l'inoculation.

4° Après inoculation du bacille diphtérique 261 suivie d'injection de sérum à la dose de 1/10 c. c. :

a) : Quatre fois les sérums de 500 et de 300 unités retirés du même cheval, employés en quantité égale, nous ont permis d'intervenir utilement 10 heures après l'inoculation de la diphtérie ;

b) Une fois même le sérum de 300 unités a été efficace après 12 heures.

5° Après inoculation du bacille diphtérique n° 261 :

a) Six fois, 40 unités antitoxiques du sérum de 300 unités ou du sérum de 500 unités nous ont permis d'intervenir avec efficacité 8 heures après l'inoculation ;

b) Six fois, 25 unités de sérum de 300 unités ont encore été efficaces, alors qu'avec la même quantité d'antitoxine de sérum de 500 nous n'avons jamais pu empêcher la production d'une escarre suivie de mort dans deux cas :

c) 20 unités de l'un ou l'autre sérum nous ont presque toujours permis d'observer la formation d'escarre suivie de mort après un laps de temps variable ;

d) Au-dessous de 20 unités, les sérums précédemment étudiés n'ont jamais pu nous permettre de sauver nos animaux.

Quelquefois même la mort est survenue avant la formation de l'escarre.

IV

CONCLUSIONS

Ces expériences nous amènent donc à conclure :

« Que l'effet curatif d'un sérum ne dépend pas exclusivement de sa teneur en unités antitoxiques.

« Que le titrage de l'antitoxine, tel qu'on le pratique habituellement, ne suffit pas à rendre un compte exact de l'efficacité d'un sérum. Que celle-ci est plus exactement appréciée par ce que nous avons appelé la mesure du pouvoir thérapeutique. »

Explication des Tableaux.

Dans le tableau A, la première colonne indique la quantité de sérum injecté par rapport au poids de l'animal.

Dans le tableau B, on trouve, dans la première colonne, le nombre des heures écoulées entre le moment de l'inoculation et celui de l'injection du sérum, dans chacune des expériences signalées par leur numéro d'ordre dans les colonnes suivantes.

Dans les 2 tableaux, en tête de chacune des autres colonnes sont indiqués :
A. Bacille diphtérique employé.

B. Nombre d'unités antitoxiques que mesurent les sérums comparés.

Dans le tableau B, les colonnes autres que la première mentionnent en outre la dose de sérum injecté sous la peau représentée en volume et en unités.

La lettre S signifie survivant.

La lettre M signifie mort.

Chaque expérience compte, en outre, des témoins qui mouraient d'ordinaire avant les cobayes traités; en 36-48 heures dans le tableau B et le plus ordinairement en 96 heures dans le tableau A.

Essais préventifs. — Tableau A.

Quantité de sérum injecté par rapport au poids de l'animal.	Expérience 1 à 7 B. diph. 251.		Expérience 8 à 9 B. diph. 251.		Expérience 10 à 13 B. diph. CC.		Expérience 14 à 16 B. diph. α .		Expérience 17 à 19 B. diph. 251.	
	Sérum 200.	Sérum 500.	Sérum 50.	Sérum 500.	Sérum 200.	Sérum 500.	Sérum 200.	Sérum 500.	Sérum 300.	Sérum 500.
1/50.000	7 s.	7 s.	2 s.	2 s.	4 s.	4 s.	3 s.	3 s.	3 s.	3 s.
1/100.000	7 s.	7 s.	2 s.	2 s.	4 s.	4 s.	3 s.	3 s.	3 s.	3 s.
1/150.000	7 s.	7 s.	2 s.	2 s.	4 s.	4 s.	3 s.	3 s.	3 s.	3 s.
1/200.000	7 s.	7 s.	2 s.	2 s.	4 s.	4 s.	3 s.	3 s.	3 s.	3 s.
1/250.000	6 s. + 1 m.	3 s. + 4 m.	2 s.	2 m.	4 s.	3 s. + 1 m.	3 s.	3 m.	3 m.	3 m.
1/300.000	7 m.	7 m.	2 m.	2 m.	4 m.	4 m.	3 m.	3 m.	3 m.	3 m.

Essais curatifs. — Tableau B.

HEURES	EXP. 1 à 7. 0 c. c. 1 s. peau. B. diph. 261.		EXP. 8 à 11. 0 c. c. 1 s. peau. B. diph. C C.		EXP. 12 à 15. 0 c. c. 1 s. peau. B. diph. z.		EXP. 16 à 19. 0 c. c. 1 s. peau. B. diph. 261.		EXP. 20 à 23. 40 unités. B. diph. 261.		EXP. 26 à 32. 25 unités. B. diph. 261.	
	Sérum 200 unités.	Sérum 500 unités.	Sérum 200 unités.	Sérum 500 unités.	Sérum 200 unités.	Sérum 500 unités.	Sérum 300 unités.	Sérum 500 unités.	Sérum 300 unités.	Sérum 500 unités.	Sérum 300 unités.	Sérum 500 unités.
2 h..	7 s.	7 s.	4 s.	4 s.	4 s.	4 s.	3 s.	3 s.	6 s.	6 s.	6 s.	6 s. (escarre)
4 h..	7 s.	7 s.	4 s.	4 s.	4 s.	4 s.	3 s.	3 s.	6 s.	6 s.	6 s.	6 s. (escarre)
6 h..	7 s.	7 s.	4 s.	4 s.	4 s.	4 s.	3 s.	3 s.	6 s.	6 s.	6 s.	6 s. (escarre)
8 h..	7 s.	7 s.	4 s.	4 s.	4 s.	4 s.	3 s.	3 s.	6 s.	6 s.	6 s.	4 s. + 2 m. (escarre)
10 h..	6 s. + 1 m	1 s. + 3 m.	4 s.	4 s.	4 s.	4 s.	3 s.	3 s.	—	—	—	—
12 h..	7 m.	7 m.	4 m.	4 m.	4 m.	4 m.	1 s. + 2 m.	3 m.	—	—	—	—
14 h..	7 m.	7 m.	4 m.	4 m.	4 m.	4 m.	3 m.	3 m.	—	—	—	—
16 h..	7 m.	7 m.	4 m.	4 m.	4 m.	4 m.	3 m.	3 m.	—	—	—	—

ÉTUDE SUR UN NOUVEAU PROCÉDÉ DE RECHERCHE DE L'AMMONIAQUE ET DES SELS AMMONIACAUX

Applicable à la caractérisation des eaux potables.

PAR MM. A. TRILLAT ET TURCHET

Dans un travail paru précédemment dans ces *Annales*¹, l'un de nous a décrit un procédé basé sur l'emploi de la fluorescéine pour la recherche des eaux d'infiltration, procédé aujourd'hui souvent employé, aussi bien pour établir les relations des sources et des nappes d'eau que pour déceler dans les eaux potables les infiltrations provenant des champs d'épandage, des fosses, etc.

Dans ce dernier cas, la présence de la matière organique azotée se traduit, au moins à un moment donné, par l'apparition de l'ammoniaque ou plutôt des sels ammoniacaux provenant de sa décomposition : on a toujours attribué une grande importance à cette caractérisation.

Pour rechercher la présence de l'ammoniaque ou des sels ammoniacaux dans un liquide, on n'emploie guère que deux méthodes : la première, celle de M. Schloësing, qui consiste à séparer l'ammoniaque directement par une distillation en présence de la magnésie ; dans la seconde, on utilise le procédé de Nessler. Rappelons que ce dernier procédé consiste à combiner l'ammoniaque avec l'iodomercurate de potassium de manière à obtenir le précipité d'iodure de mercure-ammonium $\text{Az Hg}^2\text{I} + \text{H}^2\text{O}$, qui communique à l'eau une coloration jaune visible encore au 1/400,000 d'ammoniaque d'après l'auteur². La première méthode ne peut pas toujours être employée tandis que celle de Nessler est d'un usage courant pour reconnaître rapidement l'ammoniaque dans les eaux.

Au cours de recherches sur la sensibilité de ces méthodes, nous avons constaté que l'emploi du réactif de Nessler pouvait donner lieu à des interprétations erronées. On est alors obligé

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, mai 1899.

2. *Journal für prakt. Chemie*, t. CIII, p. 494. *Bulletin de Société chimique*, t. X, p. 27.

de recourir à une distillation préalable, ce qui est une complication. Tel est le cas, par exemple, lorsque l'on opère sur des eaux bicarbonatées ou calcaires : Bolley avait déjà signalé l'influence de la chaux sur la sensibilité de cette méthode. Nous avons observé que la présence de l'hydrogène sulfuré ou de sulfures alcalins était un obstacle à l'application du procédé à l'iodo-mercurate par suite de la formation du sulfure noir de mercure. Nous avons aussi constaté que la présence de l'acide carbonique et celle de certaines matières albuminoïdes entravaient la réaction, en sorte que des traces notables d'ammoniaque pouvaient être complètement masquées.

C'est ainsi que nous avons été amené à rechercher une nouvelle méthode permettant de déceler dans certains cas l'ammoniaque avec plus de sécurité que celle de Nessler, tout en étant aussi sensible et aussi rapide.

Nous allons d'abord expliquer le principe de cette méthode qui peut être utilisable dans le laboratoire, dans une foule de cas ; nous exposerons ensuite l'application spéciale que nous en avons faite pour la recherche de l'ammoniaque dans les eaux potables.

I

Le nouveau procédé que nous employons est basé sur la remarquable propriété que possède l'iode d'azote naissant de communiquer à l'eau une coloration noire intense dont la visibilité est encore appréciable pour une dose de 1/500,000 d'ammoniaque.

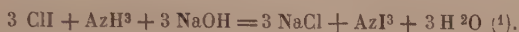
L'iodure d'azote se forme, comme on le sait, par l'action directe de l'iode sur l'ammoniaque. L'application de ce procédé est inutilisable pour le but cherché, car la réaction ne se produit plus lorsque l'ammoniaque est très étendue.

On a aussi indiqué la formation de l'iodure d'azote par la dissolution préalable de l'iode dans de l'iodure de potassium : ce moyen n'est pas davantage applicable.

Par contre, si l'on provoque la formation intermédiaire du chlorure d'iode, la réaction a lieu instantanément d'après la formule :



Mais le précipité d'iodure d'azote est peu stable en présence de l'acide chlorhydrique. Il faut opérer, pour que la coloration soit appréciable, en présence d'un alcali, en sorte qu'il est plus exact de remplacer l'équation précédente par la suivante :



La mise en œuvre de cette réaction est extrêmement simple. Il suffit d'additionner l'eau à analyser d'une solution d'iodure de potassium et d'y ajouter quelques gouttes d'une solution étendue d'hypochlorite alcalin. L'iodure est décomposé par le chlore à l'état naissant, et il se forme comme produit intermédiaire un chlorure d'iode, lequel est immédiatement décomposé par les plus petites traces d'ammoniaque.

Nous avons vérifié, conformément à nos prévisions, que cette précipitation instantanée de l'iodure d'azote provenait bien de la formation d'un chlorure d'iode : en effet, les solutions aqueuses de protochlorure et de trichlorure d'iode fournissent, immédiatement après légère alcalinisation, le même précipité d'iodure d'azote que dans la méthode précédente. Ces solutions ne présentent toutefois aucun avantage sur les premiers réactifs qui sont d'ailleurs plus faciles à se procurer.

Le remplacement de l'iode par le brome donne de moins bons résultats ; il en est de même de celui de l'hypochlorite par un hypobromite. Le précipité d'iodure d'azote est soluble en présence de l'excès d'un des deux réactifs employés : aussi doit-on, pour la réussite de la réaction, observer spécialement cette remarque et surtout éviter d'ajouter un excès d'iodure qui, par la mise en liberté d'iode libre, peut donner lieu à des confusions.

Nous avons contrôlé, par une série d'essais faits à part, qu'aucune coloration noire semblable à celle de l'iodure d'azote n'était fournie par d'autres corps que l'ammoniaque : nous avons notamment expérimenté les amines de la série grasse et de la série aromatique, les amides, les uréides, les dérivés pyridiques, les nitrates et les nitrites minéraux et organiques. Il est utile d'observer cependant que la méthylamine donne une colo-

1. La formule de constitution de l'iodure d'azote n'a pas été nettement établie : nous avons adopté la formule avec 3 molécules d'iode et qui est la plus généralement admise.

ration rouge, bleue par transparence, qui pourrait servir à la caractériser; l'aniline donne une coloration brun rougeâtre qui, sous l'influence de la chaleur ou d'un excès d'hypochlorite, donne une matière colorante. L'une et l'autre de ces colorations peuvent être facilement différenciées de celles de l'ammoniaque.

Par contre, la réaction est obtenue avec tous les sels ammoniacaux, y compris le sulfure d'ammonium dont la présence rend inapplicable la réaction de Nessler.

La salive humaine, l'urine, le suc gastrique, les jus de viandes fournissent abondamment, même en solutions aqueuses très étendues, la réaction de l'iodure d'azote : la méthode colorimétrique peut permettre, après quelques tâtonnements, d'en évaluer l'ammoniaque, en présence des substances qui les accompagnent, avec, bien entendu, les erreurs inhérentes à tous les procédés colorimétriques.

L'emploi de la réaction à l'iodure d'azote pourra donc servir dans le laboratoire dans un grand nombre de circonstances; toutefois il sera utile de faire une étude spéciale pour déterminer le meilleur mode d'emploi dans chaque cas. Voici cependant, d'une manière générale, comment nous procédons pour l'application de la méthode. On se sert d'une solution d'iodure de potassium à 10 0/0 et de la solution d'hypochlorite du commerce vendue sous le nom d'eau de Javel. Le liquide à essayer, qui doit être approximativement neutralisé, est mis dans un tube à essai et additionné de quelques gouttes de la solution d'iodure de potassium. Après agitation, on y ajoute goutte à goutte la solution d'hypochlorite jusqu'à apparition du précipité ou de la coloration noire de l'iodure d'azote. Il faut observer qu'une petite quantité d'iode est toujours mise en liberté et qu'on a intérêt à limiter l'addition d'iodure de potassium.

Enfin, en cas de doute, lorsqu'il s'agit de traces d'ammoniaque, on a la ressource de séparer l'iode de l'iodure d'azote par une simple agitation avec le chloroforme dans lequel ce dernier corps est momentanément insoluble¹.

Dans les liquides en suspension, comme le lait, il est nécessaire, quand les doses d'ammoniaque sont inférieures à $1/25,000$, de procéder à une défécation.

1. Nous avons, en effet, constaté que le chloroforme décomposait peu à peu, à la longue, l'iodure d'azote.

II

APPLICATION POUR LA RECHERCHE DE L'AMMONIAQUE DANS LES EAUX
POTABLES

Nous avons spécialement appliqué la méthode de recherche de l'ammoniaque par l'iodure d'azote pour la caractérisation de la pureté de l'eau potable.

On sait en effet que la présence d'infimes quantités d'ammoniaque ou de sels ammoniacaux dans l'eau est l'indice d'une pollution certaine. Aussi cette caractérisation a-t-elle toujours fixé l'attention des analystes. On a adopté comme limite d'ammoniaque pouvant être contenue dans 1 litre d'eau potable le chiffre de 5 à 10 de milligramme : peut-être y aurait-il lieu de réduire encore cette limite¹.

Voici le mode opératoire que nous suivons :

Dans un tube à essai, on met 20 à 30 c. c. de l'eau à analyser; on y ajoute 3 gouttes d'une solution d'iodure de potassium² à 10 0/0 et 2 gouttes d'une solution concentrée d'hypochlorite alcalin (eau de Javel du commerce). La coloration de l'iodure d'azote se produit instantanément sous forme de nuage ou de précipité brun noirâtre quand la dose d'ammoniaque est supérieure à 2 milligrammes par litre d'eau. Pour des doses inférieures, on évapore l'eau en présence d'une très petite quantité d'acide sulfurique qui est neutralisée grossièrement au moment de l'expérience.

Par ce procédé on arrive à déceler facilement l'ammoniaque à une dilution de plusieurs millièmes.

L'application de la méthode est donc très simple et s'exécute avec des réactifs que l'on a dans tous les laboratoires. Nous y ajouterons encore quelques observations complémentaires.

Comme nous l'avons déjà fait observer, la petite quantité d'iode mise en liberté, en suivant le mode opératoire décrit, communique une très légère teinte jaune paille à l'eau : cette coloration ne gêne pas l'évaluation. Dans des cas douteux, on a toujours la ressource de faire cette évaluation comparative avec de l'eau pure : un excès d'hypochlorite fait dispa-

1. Congrès international de Bruxelles, 1885.

2. Il faut s'assurer surtout de la pureté de l'iodure de potassium qui contient parfois des traces de sels ammoniacaux.

raitre complètement la coloration de l'iode, tandis que celle de l'iodure subsiste encore. Enfin on peut utiliser, comme nous l'avons dit, la propriété du chloroforme qui sépare en partie l'iode mis en liberté de l'iodure d'azote : dans la plupart des cas, cette manipulation est inutile, la coloration de l'iode mis en liberté, quand on l'emploie en très petites quantités, ne permettant pas la confusion.

La coloration de l'iodure d'azote s'atténue peu à peu, surtout si l'un des deux réactifs est en excès : on peut la faire apparaître à nouveau. Elle est assez stable pour permettre de faire des évaluations colorimétriques par comparaison avec des solutions d'ammoniaque d'un titre connu. A cet effet, on prépare une série de types variant au 1/10,000 et on compare les colorations, l'évaluation colorimétrique étant appréciable dans ces limites. Il faut avoir le soin d'opérer sur la même quantité de liquide disposé dans des tubes à essai bien calibrés et de même nuance.

Voici les résultats qu'elle a donnés en opérant comparative-ment avec le procédé Nessler sur une eau contenant 1/100,000 d'ammoniaque et additionnée de diverses substances :

Tableau indiquant l'influence de certains matériaux sur la sensibilité des méthodes de recherche de l'ammoniaque. Exemple sur une eau contenant 1/100,000 d'ammoniaque et chargée de diverses substances.

	NESSLER				IODURE D'AZOTE			
	1/10.000	1/20.000	1/50.000	1/100.000	1/10.000	1/20.000	1/50.000	1/100.000
Eau bicarbonatée.	0	col. att.	col. att.	+	+	+	+	+
Eau sulfureuse..	0	0	col. att.	col. att.	+	+	+	+
Eau calcaire....	col. att.	col. att.	col. att.	+	col. att.	+	+	+
Eau chargée de chaux.....	col. att.	col. att.	col. att.	+	col. att.	col. att.	+	+
Eau avec matière albuminoïde ..	0	col. att.	col. att.	+	col. att.	+	+	+
Eau additionnée d'urine.....	col. att.	col. att.	+	+	+	+	+	+

Le signe + indique que la coloration s'est produite normalement, le signe 0 qu'elle n'a pas eu lieu; l'abréviation col. att. que la coloration a été atténuée.

Dans beaucoup de cas les eaux suspectes contiennent de la matière albuminoïde, elles peuvent être chargées plus ou moins de sulfures alcalins, dont l'accumulation peut faire échec à la réaction de Nessler. Le tableau indique que l'influence des sulfures est négligeable dans le cas de la 2^e méthode.

Enfin, nous avons dosé, au moyen de l'iodure d'azote, l'ammoniaque contenue dans des eaux d'égout qui nous ont été fournies et contrôlées par le service des eaux de Montsouris : on a comparé les résultats avec ceux provenant des dosages effectués sur les mêmes échantillons, avec les méthodes Schlöesing et Nessler.

Tableau comparatif des doses d'ammoniaque contenues dans des eaux d'égout et évaluées d'après les trois méthodes.

EAUX D'ÉGOUT	EXTRAIT à 100° par litre.	MÉTHODE Schlœsing.	MÉTHODE Nessler.	MÉTHODE à l'iodure d'azote
Bassin de Clichy	2 gr. 12	23 mgr. 9	9 mgr.	18 mgr.
Région de Méry.....	0 gr. 84	21 mgr. 4	13 mgr.	23 mgr.
Conduite sous Poissy.	2 gr. 98	25 mgr. 2	10 mgr. 5	17 mgr. 5
Collecteur de Triel..	?	27 mgr. 2	11 mgr. 4	23 mgr. 40

En résumé, la réaction de l'iodure d'azote, d'une exécution simple et facile, pourra rendre service dans beaucoup de cas pour déceler l'ammoniaque : en suivant le mode opératoire que nous avons indiqué, elle pourra spécialement être utilisée pour caractériser la pureté des eaux et y déceler les infiltrations des matières organiques en décomposition. A ce titre elle pourra être employée concurremment avec le fluorescope dont le principe a été décrit par l'un de nous¹.

1. *Annales de l'Institut Pasteur (loc. cit.).*

Réaction de la Tortue terrestre

A QUELQUES MALADIES INFECTIEUSES

PAR MM. REMLINGER ET OSMAN NOURI

Les animaux dits « de laboratoire » appartiennent à un petit nombre d'espèces. Un intérêt considérable s'attache à ce que ce nombre soit augmenté. C'est cette considération qui nous a décidés à étudier la réaction, vis-à-vis de quelques microbes pathogènes, de la tortue terrestre, un peu délaissée jusqu'ici — comme du reste la plupart des animaux à sang-froid — dans les laboratoires de bactériologie. On connaît les travaux de M. Friedman sur la tuberculose des chéloniens. On sait que M. Metchnikoff a signalé la très grande résistance de la tortue des marais (*Emys orbicularis*) à la toxine tétanique injectée à hautes doses dans le tissu cellulaire sous-cutané. A notre connaissance tout au moins, la réceptivité des tortues n'a pas été étudiée à l'égard d'autres maladies infectieuses.

Nos recherches ont porté sur *Testudo Græca*, très commune aux environs de Constantinople et simple variété de *Testudo Mauritanica* du midi de la France. La carapace qui recouvre les tortues a pour résultat de limiter beaucoup les modes d'inoculation. On doit se restreindre à l'inoculation sous-cutanée — dont le lieu d'élection paraît être, comme chez la souris, la base de la queue; — à l'inoculation intracrânienne, très facile à pratiquer avec l'aide d'un simple foret; aux inoculations intramusculaire, intraoculaire, intranasale, pour ne pas parler de procédés exceptionnels comme l'ingestion et l'inhalation. L'autopsie se pratique très facilement en sciant la carapace à l'aide d'une scie à main aux deux intersections du bouclier et du plastron, puis en rabattant le plastron après section des muscles adhérents. Au cours de ce dernier temps, il faut prendre garde aux viscères très rapprochés et que la lame du couteau pourrait

blessier et contaminer... On sait que la température de la tortue est celle du milieu ambiant (9 à 15° au cours de nos recherches). Il est facile de faire vivre cet animal dans une étuve à air chaud réglée à 35 et même à 37°. Ces températures sont par elles-mêmes incapables de déterminer la mort. Elles constituent néanmoins un procédé simple et commode d'atténuation de la résistance. Notons enfin que dans toutes nos expériences le poids des tortues oscillait entre 500 et 2,000 grammes.

Charbon. — La culture dont nous nous sommes servis tuait, à la dose de 1 c. c., le cobaye sous la peau en 37 heures. Injectée à la tortue à raison de 1 à 4 c. c. dans le tissu cellulaire de la base de la queue, cette même culture ne provoquait aucune réaction. lorsque l'animal était laissé à la température ambiante (7 observations). Au contraire, si après l'inoculation on fait vivre les tortues à l'étuve à 35°, la mort s'ensuit le plus souvent. 11 tortues dont la résistance avait été ainsi diminuée ont fourni 6 cas de mort. Celle-ci est survenue du 9^e au 15^e jour. A l'autopsie, les lésions présentaient une grande analogie avec celles du charbon expérimental des animaux à sang chaud. Le sang était noir, poisseux, non coagulé; les viscères, le foie notamment, congestionnés. Il existait dans le péritoine une sérosité hématique souvent abondante et la vessie distendue renfermait une urine sanguinolente.

L'examen direct du sang du cœur, de la pulpe hépatique, de la sérosité péritonéale, de l'urine, montrait des bacilles charbonneux extrêmement nombreux. Obtenus en culture pure et inoculés au cobaye, ceux-ci n'avaient rien perdu de leur virulence pour cet animal.

Dans une expérience, nous avons vu succomber au charbon 1 tortue laissée à la température ambiante. Trois tortues avaient reçu dans la muqueuse nasale 2 c. c. d'une culture en bouillon. L'une d'elles succomba 8 jours plus tard avec de nombreux bacilles dans le sang et les organes, les 2 autres demeurèrent indemnes. Il est possible qu'au cours de l'inoculation, un vaisseau ait été ouvert et une partie de la culture injectée à son intérieur, ce qui aurait favorisé l'infection.

Quoi qu'il en soit de ce dernier point, cette expérience positive est de nature à faire admettre qu'au point de vue de la

réceptivité au charbon, les chéloniens peuvent prendre place entre les batraciens et certains poissons. On sait, en effet, que Gibier et Mesnil n'ont pu contaminer la grenouille, Catterina, le triton, qu'en les maintenant à une température de 35°. Sabrazès et Colombot ont montré, au contraire, que l'hippocampe était réceptif au charbon dans les conditions normales de son existence.

Nous devons insister sur ce fait que l'envahissement, par le bacille charbonneux, de l'organisme des tortues vivant à l'étuve à 35°, ne paraît être nullement, comme chez la grenouille dans les expériences de Mesnil, un phénomène agonique ou cadavérique. La température de 35-37° est à elle seule insuffisante à amener la mort de l'animal.

Morve. — La transmission de la morve à un animal à sang froid n'a encore, à notre connaissance, tenté aucun expérimentateur. Le bacille employé par nous tuait le cobaye en 8 jours dans le péritoine, à la dose de 4 c. c. Quatre tortues inoculées sous la peau à la dose de 1 à 4 c. c. et abandonnées ensuite à la température extérieure ont survécu. Quatre autres inoculées dans la muqueuse nasale avec 1 c. c. de culture ont fourni 2 morts et 2 survies. Dans les deux cas, la mort s'est produite le 11^e jour. A l'autopsie, on constatait une congestion banale des organes et un exsudat péritonéal sanguinolent. Déjà, l'examen direct permettait de constater, dans le sang, la pulpe hépatique, la sérosité péritonéale, l'existence de bacilles de la morve. Les ensemencements en bouillon et sur gélose donnaient, après repiquage sur la pomme de terre, des colonies caractéristiques. Ces mêmes cultures inoculées au cobaye mâle le tuaient classiquement. Le passage à travers l'organisme de la tortue n'avait rien fait perdre de sa virulence au *B. Mallei*. La tortue est donc sensible à la morve dans les conditions ordinaires de l'expérimentation. Si on fait vivre cet animal à la température des animaux à sang chaud, sa réceptivité s'en trouve très nettement augmentée.

Dix tortues mises à l'étuve à 35°, aussitôt après avoir reçu sous la peau de 2 à 3 c. c. de culture virulente, ont fourni 6 cas mortels du 12^e au 15^e jour. Dans chaque cas, l'autopsie a été faite et la généralisation du bacille vérifiée par l'examen direct

et la culture sur pomme de terre. Les tortues témoins, mises à l'étuve à 35° avec les précédentes, sans avoir été inoculées ont toutes survécu. Nous devons insister sur ce fait que chez la tortue morveuse, l'examen direct permet déjà de déceler le microbe spécifique, dans le sang et la pulpe hépatique, alors que chez le cobaye les cultures elles-mêmes ne donnent qu'exceptionnellement un résultat positif. Dans le sang et les organes des tortues mortes du charbon, les bactériidies sont de même beaucoup plus nombreuses que dans les cadavres des animaux à sang chaud.

Rage. — Si le charbon et la morve peuvent être transmis à la tortue, il n'en est pas de même de la rage. Nos expériences ont été faites avec du virus fixe. Les modes d'inoculation ont été l'injection sous-cutanée ou intramusculaire, l'inoculation intra-oculaire, enfin l'inoculation intracérébrale après trépanation. Les doses ont varié entre quelques gouttes (cerveau) et 5 à 10 c. c. d'une émulsion épaisse (voies sous-cutanée et intramusculaire). Toutes ces tentatives ont échoué. Sur 15 animaux inoculés, aucun n'a présenté de symptôme morbide. Le séjour à 35° n'exerce aucune influence sur la réceptivité. *Testudo Græca* se comporte donc, vis-à-vis de la rage, comme les autres animaux à sang froid dont on admet à peu près unanimement l'immunité. Högyes dit avoir triomphé de la résistance de la grenouille en la faisant vivre à la température des mammifères, mais Babès n'a jamais réussi à répéter cette expérience. Nous avons échoué également, de même que chez les poissons.

L'immunité si complète de la tortue trouve-t-elle son explication dans des propriétés rabicides du sang ou de la substance nerveuse? Les expériences suivantes permettent de répondre négativement. A deux reprises, nous avons émulsionné un peu de virus fixe dans du sérum de tortue. Après 24 heures de séjour à la glacière, le virus était lavé et débarrassé de l'excès de sérum, il servait ensuite à trépaner des lapins. Ceux-ci mouraient constamment quelques heures avant les témoins inoculés sous la dure-mère avec le seul virus fixe.

La substance nerveuse n'est pas davantage pourvue de propriétés antirabiques. Un poids égal de virus fixe et de cerveau de tortue est émulsionné dans de l'eau distillée. Le mélange,

laissé en présence 24 heures, sert à inoculer des lapins. Ceux-ci meurent avec un retard insignifiant sur les témoins. On sait que chez les oiseaux très résistants à la rage, le sang ne possède également aucune propriété antirabique. M. Babès a montré d'autre part que la substance nerveuse normale exerce vis-à-vis du virus rabique une légère action atténuante.

Tétanos et autres affections. — *Testudo Græca* se comporte vis-à-vis du tétanos comme *Emys orbicularis*, étudiée par M. Metchnikoff. Elle est complètement réfractaire. Nous avons inoculé sous la peau, ou dans les muscles de la patte, des doses massives (jusqu'à 10 c. c. dans une observation) d'une culture très virulente tuant le cobaye en 36 heures à la dose de quelques gouttes. Nous n'avons jamais constaté la moindre contracture. L'injection de culture tétanique dans le cerveau, après trépanation, demeure également sans résultat. Le séjour à l'étuve à 37° n'exerce aucune influence sur la réceptivité de l'animal. Chez *Testudo Græca*, comme chez *Emys orbicularis*, la toxine tétanique injectée sous la peau passe dans le sang et y demeure un temps très long. Une tortue ayant reçu 5 c. c. de toxine a été sacrifiée deux mois plus tard. Un c. c. de son sang injecté dans les muscles de la cuisse d'un cobaye a causé, après quelques heures d'incubation, un tétanos rapidement mortel.

Nous avons inoculé enfin à *Testudo Græca*, à doses massives et par diverses voies, un grand nombre d'espèces microbiennes, telles que le staphylocoque pyogène, le streptocoque de l'érysipèle, le colibacille, le bacille typhique, la pasteurellose aviaire, le bacille du rouget, etc. Toutes ces tentatives sont demeurées infructueuses. L'inoculation intracérébrale elle-même n'a jamais fourni le moindre résultat. Le séjour des animaux inoculés à l'étuve à 37° est aussi demeuré sans effet.

L'immunité très complète de la tortue terrestre, vis-à-vis d'un grand nombre de microbes pathogènes, est de nature à faire supposer que chez cet animal la phagocytose s'exerce de façon particulièrement active. Cependant, à l'autopsie d'une tortue ayant succombé au charbon ou à la morve, on est frappé de ce que, dans le sang et les organes, les microbes pathogènes sont sensiblement plus abondants que chez les animaux à sang chaud et l'on est tenté d'en inférer au contraire à un fléchissement de

la phagocytose. Le petit nombre de globules blancs dans le sang des chéloniens, l'absence de rate chez ces animaux, viennent à l'appui de cette conclusion. Il y a là plusieurs problèmes intéressants. Nous nous proposons de les aborder dans un travail ultérieur.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

